

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

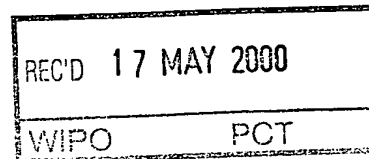
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP00/2064
PRIORITY

DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

Die Anmelderin GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH in
Oberschleißheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Auf HERV-LTR-Sequenzen basierende retrovirale Expressionsvektoren"

am 10. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
C 12 N 15/867 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 19. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 10 650.9

Brand

PATENT- UND MARKENANWÄLTE
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DIPL.-CHEM. DR. HORST REINHARD (-1998)
DIPL.-ING. UDO SKUHRA
DIPL.-ING. REINHARD WEISE
DIPL.-BIOL. DR. WERNER BEHNISCH
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER*
DIPL.-PHYS. DR. STEPHAN BARTH
DIPL.-ING. DIPL.-ING. GLYN CHARLES (DPA)

FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN

POSTF. / P.O. BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN

* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P11045
Dr.B/La

9. März 1999

Anmelder:

GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim

Auf HERV-LTR-Sequenzen basierende
retrovirale Expressionsvektoren

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft retrovirale Expressionsvektoren mit zellspezifisch regulierbaren Promotoren. Die Vektoren sind beispielsweise zur zellspezifischen Expression therapeutisch wertvoller Gene im Rahmen einer Gentherapie einsetzbar.

Die Erfindung beschreibt retrovirale Expressionsvektoren, enthaltend zumindest die nachfolgenden Elemente in funktioneller Anordnung:

- a) DNA-Sequenzen zur Verpackung der Vektor-RNA und zur zellspezifischen Expression von Proteinen oder Peptiden, die von heterologen DNA-Nukleotidsequenzen kodiert werden;
- b) eine oder mehrere für ein Protein oder Peptid kodierende DNA-Nukleotidsequenzen, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenzen zur zellspezifischen Expression eine zellspezifisch regulierbare Promotorregion aus einer humanen endogenen retroviralen DNA-Nukleotidsequenz (HERV) enthalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft retrovirale Expressionsvektoren mit zellspezifisch regulierbaren Promotoren. Die Vektoren sind beispielsweise zur zellspezifischen Expression therapeutisch wertvoller Gene im Rahmen einer Gentherapie einsetzbar.

Retroviren sind RNA-Viren, bei denen die viralen Gene von einem einzelsträngigen RNA-Molekül kodiert werden. Nach Eindringen der Viren in die Zelle wird die virale RNA in ein doppelsträngiges DNA Molekül durch die reverse Transkription umgewandelt. Die DNA dringt in den Kern ein und integriert in das zelluläre Chromosom. Die integrierte virale DNA-Form, das sogenannte Provirus, bildet die Matrize zur Expression der viralen Gene.

Die Integration des viralen Genoms in das zelluläre Chromosom ist ein obligatorischer Teil der viralen Replikation und wird durch viral kodierte Enzyme vermittelt. Es scheint, daß, mit wenigen Ausnahmen, das Vorliegen des retroviralen Genoms in der Zelle, die Expression seiner Gene und die Bildung von Viruspartikeln die Lebensfähigkeit der infizierten Zelle nicht oder kaum beeinträchtigt.

Retroviraler Gentransfer wird dazu benutzt, funktionelle Gene, insbesondere therapeutisch wertvolle Gene, in die Zellen einzuführen, ohne die Proliferationsfähigkeit der Wirtszelle zu beeinflussen. Aufgrund ihres Replikationsmodus eignen sich Retroviren für eine derartigen Gentransfer. In der einfachsten Ausgestaltungsform wird zumindest ein Teil der viralen Gene durch ein Gen von Interesse ersetzt und, unter Zuhilfenahme des effizienten viralen Infektionsprozesses, wird dieses Gen von Interesse in die Zielzelle transferiert.

Retrovirale Vektoren eignen sich deshalb zur Gentherapie, weil die Infektion durch Retroviren hocheffizient verläuft und die retroviralen Vektoren so modifizierbar sind, daß sie heterologe DNA aufnehmen und stabil in das Wirtszellgenom integrieren können. Eine Vielzahl von retroviralen Vektoren wurde in den letzten Jahren entwickelt, und nur beispielsweise wird hier auf die Übersichtsartikel von Günzburg et al. (1996) und Robbins et al. (1998) hingewiesen.

Eine mögliche bevorzugte Ausgestaltungsform für retrovirale Vektoren sind sogenannte ProCon-Vektoren, die zum ersten Mal in der WO 96/07748 beschrieben wurden. Zur Offenbarung wird vollständig auf diese Druckschrift Bezug genommen.



ProCon-Vektoren tragen heterologe Promotor- und wahlweise weitere Regulationselemente in der 3'LTR, die, nach Infektion, dupliziert und an die 5'LTR in der Zielzelle transloziert werden und die befähigt sind, die Expression von Markergenen oder therapeutischen Genen zu regulieren. Diese heterologen Gene sind nicht direkt mit dem Promotor verbunden, sondern werden in das Innere des Vektors inseriert.

ProCon-Vektoren umfassen einen 5'LTR-Abschnitt der Struktur U3, R, U5 sowie zumindest eine kodierende und/oder nicht-kodierende Sequenz sowie einen 3'LTR-Bereich, der einen vollständig oder teilweise deletierten U3-Abschnitt umfaßt, wobei der deletierte U3-Abschnitt durch eine Polylinker-Sequenz ersetzt wurde, worauf sich der R- und U5-Abschnitt anschließt.

Die Vermehrung dieser Vektoren erfolgt mit Hilfe einer Helferzelllinie, die große Mengen der viralen Proteine produziert, die vom Expressionsvektor selbst nicht mehr synthetisiert werden. Die Helferzelllinie ist jedoch nicht mehr in der Lage, ein replikationskompetentes Virus zu produzieren. Diese Zelllinie wird auch als Verpackungszelllinie bezeichnet und umfaßt eine mit mindestens einem zweiten Plasmid transfizierte Zelllinie, das diejenigen Gene trägt, die eine Verpackung des modifizierten retroviralen Vektors ermöglichen.

Die für das modifizierte Retrovirus (Expressionsvektor) kodierende DNA wird in die Verpackungszelllinie transfiziert. Unter diesen Bedingungen wird das modifizierte retrovirale Genom einschließlich der inserierten therapeutischen Gene bzw. Markergene transkribiert und in die retroviralen Partikel verpackt (rekombinate virale Partikel). Dieses rekombinante Virus wird dann zur Infektion der Zielzellen eingesetzt; das Genom des modifizierten Retrovirus, d.h. des Expressionsvektors, wird in das Genom der Zielzellen integriert, und zwar zusammen mit den Markergenen bzw. den therapeutischen Genen. Eine mit den so erzeugten rekombinanten viralen Teilchen infizierte Zelle kann ein neues Vektorvirus nicht mehr produzieren, da in diesen Zellen keine weiteren viralen Proteine mehr vorliegen. Die in die Wirtszelle integrierte DNA des Expressionsvektors mit den therapeutisch wertvollen Genen bzw. den Markergenen liegt in der zellulären DNA integriert vor und kann nunmehr in der Zelle exprimiert werden.

Therapeutisch wertvolle Gene, die über derartige retrovirale Expressionsvektoren zur Expression gebracht werden, sollen bevorzugt in zell- und gewebespezifischer Form exprimiert werden. Hierzu werden zellspezifische Regulationssequenzen in der LTR-Sequenz des Expressionsvektors eingesetzt. Diese zellspezifischen Regulationssequenzen umfassen bei-

spielsweise zellspezifisch regulierbare Promotorabschnitte, zellspezifische Enhancersequenzen sowie Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Die Promotoren liegen im U3-Abschnitt der LTR.

Zur Zeit werden in retrovirale Vektoren zelluläre Promotorsequenzen oder Promotorsequenzen exogener Retroviren eingesetzt.

Zelluläre Promotoren sind häufig auf zusätzliche Signalstrukturen angewiesen, die in großer Distanz stromaufwärts oder stromabwärts des Promotors liegen können. Es hat sich deshalb immer wieder als schwierig erwiesen, starke, gewebespezifische zelluläre Promotorsequenzen zu isolieren und in retrovirale Vektoren zu klonieren. Promotoren exogener Retroviren haben den Vorteil, daß sie in der retroviralen LTR auf kleinem Raum alle benötigten regulativen Elemente enthalten und daher weitgehend unabhängig von den benachbarten DNA-Sequenzen des Integrationsortes transkribiert werden. Ein schwerwiegender Nachteil ist jedoch, daß sie zwar sehr stark, aber nicht gewebespezifisch sind und in der Regel in allen Zelltypen gleich stark exprimiert werden.

Es ist deshalb eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue retrovirale Expressionsvektoren bereitzustellen, die zwar die Vorteile der retroviralen Promotoren nutzen, alle für die Transkription erforderlichen Signalstrukturen auf engem Raum innerhalb der U3 und R-Region zu konzentrieren, die damit verbundenen Nachteile jedoch vermeiden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß in retrovirale Expressionsvektoren ein zellspezifisch regulierbarer Promotorabschnitt aus einer humanen endogenen retroviralen DNA-Nukleotidsequenz (HERV) eingesetzt wird. Diese Promotorsequenzen humaner endogener retroviraler Viren liegen bereits in der Wirtszelle vor, und es wurde erfindungsgemäß gefunden, daß sie sich in hervorragender Weise zur Regulation der zellspezifischen Expression von Markergenen und therapeutisch wertvollen Genen eignen.

Endogene Retroviren (ERV) sind im Genom aller Zellen eines Organismus zu finden. Sie werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen und können durch Umwelteinflüsse reaktiviert werden. Das menschliche Genom besteht zu etwa 2% aus endogenen Retroviren und retroviralen Sequenzen, wobei solitäre HERV-LTRs mit 20000 – 40000 Kopien pro Genom vertreten sind (Tab. 1) (Leib-Mösch et al., 1993; Wilkinson et al., 1994; Patience et al., 1997).



Da HERV-Sequenzen bereits vor 30 – 40 Millionen Jahren in das Genom von Primaten integriert sind, kann davon ausgegangen werden, daß im Verlauf der Evolution die meisten pathogenen Sequenzen durch Mutationen und Rearrangements aus dem Provirus eliminiert bzw. so verändert wurden, daß sie für den Organismus nicht mehr von Nachteil sind. Retrovirale Vektoren, die aus derartigen Sequenzen konstruiert werden, haben gegenüber Vektoren aus animalen Viren den Vorteil, daß keine neuen viralen Sequenzen in das Genom eingebracht werden müssen. Auch durch Rekombination mit bereits im Genom vorhandenen HERV-Sequenzen können keine neuartigen Retroviren entstehen, wie das z.B. der Fall wäre, wenn Retroviren anderer Spezies als Vektoren eingesetzt werden. Aus diesem Grund kann die Verwendung dieser Sequenzen zur Konstruktion retroviraler Vektoren das Sicherheitsrisiko minimieren. Desweiteren könnten im Genom enthaltene homologe Regionen für eine gewebespezifische Integration der retroviralen Vektoren in bestimmte Stellen eines Chromosoms genutzt werden.

HERV-Elemente haben während der Evolution eine Reihe zellulärer Funktionen übernommen. So werden Promotor- und Enhancer-Elemente von HERV-LTRs zur Steuerung der Transkription zellulärer Gene benutzt (Kato et al., Feuchter-Murthy et al., 1993; Di Christofano et al., 1995). Ein Beispiel für die Verwendung von LTR-Regulationselementen zur gewebespezifischen Expression eines zellulären Gens ist das Amylase-Gen des Menschen. Dieses Gen wird durch die LTR eines HERV-E Elements kontrolliert und dadurch spezifisch nur in den Speicheldrüsen exprimiert (Ting et al., 1992). Darüber hinaus haben Schulte und Mitarbeiter (1996) gezeigt, daß die Insertion eines endogenen Retrovirus in die 5' nicht translatierte Region des Pleiotrophin-Gens für dessen Trophoblasten-spezifische Aktivität verantwortlich ist (Schulte et al., 1996). In anderen Fällen können polyA-Signale von HERV-LTRs auch dazu dienen, zelluläre Transkripte zu polyadenylieren (Mager, 1989; Goodchild et al., 1992).

Der große Vorteil beim Einsatz retroviraler Promotoren liegt darin, daß, wie bereits oben ausgeführt, alle für die Transkription erforderlichen Signalstrukturen auf engem Raum innerhalb des U3-Bereichs und des R-Bereichs der LTR lokalisiert sind, da Retroviren möglichst unabhängig von der Umgebung ihres Integrationsortes transkriptionsaktiv bleiben müssen. Da diese HERV-Promotoren seit Millionen Jahren im Primatengenom persistieren, haben sie sich im Laufe der Evolution so angepaßt, daß sie wie zelluläre Promotoren zelltyp-spezifisch aktiv sind, und somit die Vorteile zellulärer und retroviraler Promotoren in sich vereinen.

Die Transkription der HERVs wird von einem klassischen RNA Polymerasell-Promotor aus gestartet (Wilkinson et al., 1994). Dieser Promotor ist innerhalb der LTR-Region lokalisiert. Das HERV-Transkript besteht daher nicht aus der vollständigen Kopie des Provirus. Um den Verlust der Transkriptionskontrollelemente zu kompensieren, haben diese Elemente den Mechanismus der reversen Transkription entwickelt, mit dem die verlorengegangenen Sequenzen an beiden Seiten der Elemente regeneriert werden, woraus wiederum die LTRs entstehen. Neben Promotorsequenzen enthalten HERV-LTRs noch eine Vielzahl verschiedener Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Seifarth et al., 1998), die für die Gewebespezifität der Expression verantwortlich sind.

Obwohl eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zwischen HERVs und exogenen animalen Retroviren wie MLV oder MMTV besteht, wurden HERV-Sequenzen und insbesondere Promotoren von HERVs nie als mögliche Kandidaten für die Entwicklung retroviraler Expressionsvektoren in Betracht gezogen. Sie wurden, ganz im Gegenteil, im Zusammenhang mit einer Gentherapie bisher ausschließlich als Störfaktoren betrachtet (Patience et al., 1997). Es wurde befürchtet, daß sie in der Zielzelle durch Rekombinationen aufgrund von Sequenzhomologien mit dem therapeutischen Vektor interferieren könnten. Diese Befürchtungen konnten bislang zwar nicht experimentell bestätigt werden, jedoch mit der Entwicklung sehr effizienter humaner Verpackungszelllinien tauchte das Problem des Mitverpackens und der ungewollten Übertragung möglicherweise infektiöser HERV-Sequenzen auf. Daher wurde die mögliche Verpackung exprimierter HERV-Sequenzen in Virionen, die auf MLV basieren, ausführlich untersucht. Patience et al. (1998) identifizierten mRNA-Transkripte mehrerer verschiedener HERV-Familien wie HERV-K und HERV-H in humanen Verpackungszelllinien. Jedoch konnten selbst mit einem hochsensitiven RT-PCR Test keine dieser Sequenzen in den von den Zellen freigesetzten MLV-Vektor-Partikeln nachgewiesen werden.

Nach diesen Befunden schien eine Verpackung und Übertragung von HERV-Sequenzen und damit schließlich auch HERV-basierender Vektoren in MLV-Verpackungssystemen ausgeschlossen zu sein. Zwar weisen HERV-Gene eine Sequenzhomologie zu MLV-Genen von 50 – 65 % auf, jedoch besitzen gerade die für die Verpackung und Infektion essentiellen Bereiche, insbesondere das zwischen der 5' LTR und der gag-Region lokalisierte Verpackungssignal und die LTR selbst, keine erkennbare Sequenzhomologie zu den entsprechenden MLV-Sequenzen. Effiziente HERV-Verpackungssysteme hingegen sind zur Zeit ebenfalls nicht vorstellbar, da bislang keine Zelllinien bekannt sind, die in ausreichenden Mengen HERV-Partikel produzieren.

Die vorliegende Erfindung löst somit das Problem von retroviralen Expressionsvektoren, die eine zell- und gewebespezifische Expression von Fremdgenen (Gen von Interesse) steuern, dadurch, daß Expressionsvektoren bereitgestellt werden, die, in funktioneller Anordnung, zumindest die nachfolgenden Elemente enthalten:

- a) DNA-Sequenzen zur Verpackung der Vektor-RNA und zur zellspezifischen Expression von Proteinen oder Peptiden, die von heterologen DNA-Nukleotidsequenzen kodiert werden ;
- b) ein oder mehrere für ein Protein oder Peptid kodierende heterologe DNA-Nukleotidsequenzen (Transkriptionseinheit);

die DNA-Sequenzen zur zellspezifischen Expression sind dadurch charakterisiert, daß sie eine zellspezifisch regulierbare Promotorregion umfassen, die aus einem humanen endogenen retroviralen Virus, insbesondere der LTR-Sequenz dieses Virus, stammen.

Der Promotorbereich aus einer HERV-Sequenz kann den gesamten LTR-Bereich des HERV umfassen. In weiteren Ausführungsformen der Erfindung umfaßt der Promotorbereich jedoch nur den U3-Bereich oder den R-U3-Bereich der HERV-LTR .In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird neben diesen Bereichen zusätzlich der nicht translatierte Bereich zwischen der 5' LTR und den gag-Genen vom Promotorabschnitt mit umfaßt. Erfindungsgemäß wurde nämlich festgestellt, daß auch in diesem Bereich Sequenzen lokalisiert sind, die eine zellspezifische Expression von Proteinen bzw. Peptiden steuern, d.h. für diese zellspezifische Expression zumindest mit verantwortlich sind.

Die Promotoren sind Teilabschnitte der DNA, die für den Start der Transkription der zugeordneten Strukturgene notwendig ist. Der Promotor beinhaltet den Startpunkt der Transkription, die Erkennungs- und Bindungsstelle für die RNA-Polymerase. Der Promotor kann auch weitere Sequenzen umfassen, an die regulatorische Proteine binden können und dadurch spezifisch die Initiation der Transkription regulieren. Beispiele für derartige Proteine sind Transkriptionsfaktoren und Repressoren. Beispiele für diese Regulationselemente der Transkriptionsaktivität sind die CAAT-Box, die GC-Box und die TATA-Box. Die Promotoren werden von einer Polymerase des Typs II erkannt.

Die Promotorabschnitte zur zellspezifischen Expression von Fremdproteinen aus HERVs können wahlweise mit weiteren Sequenzen kombiniert werden, die aus exogenen Retroviren stammen und die zellspezifische Expression fördern. Auch eine Kombination mit Regulati-

onssequenzen aus zellulären Genen ist denkbar, um die zellspezifische Expression zu unterstützen.

Der erfindungsgemäße retrovirale Expressionsvektor enthält weiterhin zumindest DNA-Sequenzen zur Verpackung des Vektors durch eine Verpackungs-Helferzelllinie. Die DNA-Sequenzen zur Verpackung sind zwischen der 5' LTR und dem gag-Gen lokalisiert. Der retrovirale Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung enthält ein oder mehrere Transkriptionseinheiten, die für eine Aminosäuresequenz kodieren. Die Aminosäuresequenz steht für ein Protein oder Peptid. Es können beliebige Sequenzen in den Expressionsvektor inseriert werden, die für ein beliebiges Protein oder Peptid von Interesse kodieren. Derartige Proteine oder Peptide können beispielsweise von Markergenen, therapeutisch wertvollen Genen, antiviral wirkenden Genen, Antitumorgenen und/oder Zytokingenen kodiert werden. Diese Liste läßt sich beliebig ergänzen. Die in den retroviralen Expressionsvektor einsetzbaren Gene sind dem Fachmann bekannt. Die Art der eingesetzten Gene hängt vom Anwendungszweck des erfindungsgemäßen Vektors ab.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können beispielsweise in der Gentherapie eingesetzt werden, um heterologe DNA in Targetzellen zu transferieren, um Krankheiten einer spezifischen Therapie zugänglich zu machen. Die Vektor-DNA wird in die ausgewählten Targetzellen derart eingeführt, daß die heterologe DNA in der Zielzelle exprimiert und das durch die DNA kodierte Produkt produziert wird. Hierunter fallen insbesondere solche Gene zur Expression von Proteinen, die in der Zielzelle nicht oder nicht mehr oder in nicht ausreichender Menge produziert werden, so daß sich ein Krankheitszustand einstellt. Die Erfindung umfaßt nicht nur solche Proteine bzw. Peptide, die natürlicherweise vorkommen, sondern auch solche, die in einer Weise abgeändert wurden, daß ein gewünschter Effekt erreicht wird, beispielsweise eine höhere Aktivität eines Enzyms, die Blockierung der Bindungsstelle von Viren, Zerstörung von Tumorzellen durch Suizidgene usw.

Bei den für ein Protein oder ein Peptid kodierenden DNA-Nukleotidsequenzen handelt es sich im allgemeinen um heterologe DNA, die für RNA und Proteine kodiert, die normalerweise in vivo von der Zelle, in der die Proteine bzw. Peptide exprimiert werden, nicht produziert werden. Sie kann auch als Fremd-DNA bezeichnet werden. Beliebige Proteine, beispielsweise Enzyme, Hormone und Antikörper, fallen hierunter.



Die erfindungsgemäß eingesetzten Promotorbereiche werden aus HERV-Sequenzen ausgewählt, die aus den bekannten HERV-Familien stammen. Beispiele hierfür sind HERV-K, HERV-H, HERV-E, HERV-L, HERV-T, HERV-R, HERV-I, HERV-P, ERV9.

Selbstverständlich können auch andere, zur Zeit noch nicht bekannte HERV-Familien gescreent werden, um noch unbekannte, die zellspezifische Expression steuernde Promotorsequenzen aufzufinden.

Erfindungsgemäß bevorzugte LTR-Sequenzen aus HERVs, die zur gewebespezifischen Expression von Proteinen und Peptiden von Interesse einsetzbar sind, werden im Anhang offenbart. Sie sind in retrovirale Expressionsvektoren einsetzbar, um die erfindungsgemäß gestellte Aufgabe zu lösen. Selbstverständlich können durch an sich bekannte Methoden auch nur Teile dieser LTRs ausgewählt werden, um die in den Vektor eingesetzten Sequenzen so klein wie möglich zu halten. Mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten können die geeigneten Fragmente ausgewählt werden. Auch weitere Abänderungen dieser LTR-Sequenzen sind möglich, z.B. Punktmutationen, Insertionen, Additionen, Austausch mehrerer Nukleotide etc., um die Effizienz der gewebespezifischen Expression zu steigern und an die gewünschte Funktion anzupassen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die eingangs beschriebenen ProCon-Vektoren eingesetzt. Derartige ProCon-Vektoren umfassen einen 5' LTR-Abschnitt der Struktur U3-R-U5, ein oder mehrere Sequenzen, die für ein Protein oder Peptid kodieren, und wahlweise nicht kodierenden Sequenzen, und einen 3' LTR-Abschnitt, umfassend einen teilweise oder vollständig deletierten U3-Abschnitt, wobei der deletierte U3-Abschnitt zumindest die erfindungsgemäß eingesetzten HERV-LTR-Sequenzen umfaßt, gefolgt vom R-U5-Abschnitt. Nähere Einzelheiten sind beispielsweise in der WO96/07748 und der WO96/28564 beschrieben. Auf diese Schriften wird hier vollinhaltlich Bezug genommen.

Erfindungsgemäß wurde eine Strategie entwickelt, um zellspezifisch wirkende Promotorsequenzen aufzuspüren. Diese Strategie wird in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Selbstverständlich sind grundsätzlich auch andere Methoden zum Auffinden von zellspezifisch wirksamen HERV-LTR-Sequenzen denkbar und anwendbar. Die Erfindung ist somit nicht auf die nachfolgenden Ausführungsbeispiele beschränkt.

Die erfindungsgemäßen retroviralen Expressionsvektoren sind verpackungsdefizient, d.h. sie sind nicht in der Lage, ohne Hilfe einer Verpackungs-Helferzelllinie Viruspartikel zu produzieren. Die Erfindung umfaßt deshalb auch ein retrovirales Vektorsystem, das einen retroviralen Expressionsvektor, wie er in der vorliegenden Erfindung beschrieben wird, und eine Verpackungszelllinie mit zumindest einem retroviralen oder rekombinanten retroviralen Konstrukt enthält, das für die Verpackungsproteine des retroviralen Expressionsvektors kodiert. Derartige Verpackungszelllinien sind an sich bekannt und beschrieben. Beispielsweise wird hier auf die murine Verpackungszelllinie PA317 (Saller et al., 1998) hingewiesen.

Nachfolgend wird die Erfindung zunächst allgemein und dann anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben.

Erfindungsgemäß wurde die Eignung humaner endogener Retroviren zur Entwicklung gewebespezifischer Vektoren für die Gentherapie untersucht. Dazu wurde zunächst die Gewebespezifität der HERV pol Transkription in verschiedenen Zelllinien wie T-Zellen, Keratinozyten und Brustkrebs-Zellen in einem "Reversen Dot Blot"-Verfahren überprüft. Die Expressionsmuster der verschiedenen HERV-Familien erwiesen sich dabei durchwegs als Zelltyp-abhängig. Zur Isolierung der transkriptionsaktiven HERV-LTRs aus verschiedenen Zelllinien und Geweben wurden Primer entwickelt, mit denen spezifisch die U3/R-Regionen aus mRNA-Präparationen amplifiziert werden können. Die isolierten LTR-Sequenzen sowie einzelne Vertreter bereits bekannter LTRs wurden in Expressionsvektoren eingebaut. Die Aktivität der LTR-Promotoren wurde nach transienten Transfektion der Reporterpalmside über Luziferaseaktivität bzw. über eGFP-Fluoreszenz in verschiedenen Zelllinien getestet. Es zeigte sich, daß die Promotoraktivitäten der einzelnen HERV-LTRs deutlich in Abhängigkeit von der getesteten Zelllinie variieren. Die Promotorregion einer HERV-H LTR, die aus Astrozyten und Leberzellen isoliert worden war und sich in mehreren Versuchen als besonders aktiv in Lungenfibroblastenzellen (LC5) erwiesen hatten, wurden in zwei retrovirale Promotorkonversionsvektoren (pLESN und PLX) eingebaut, in Verpackungszelllinien getestet, die Verpackungseffizienz untersucht und überprüft, ob nach Infektion der Zielzellen eine Promotorkonversion stattgefunden hat. Zum Nachweis der Transkriptionsaktivität in den Zielzellen wurden FACS-Analysen durchgeführt.

Es wurde somit eine Methode beschrieben, mit der HERV Promotorsequenzen (U3/R-Region), die eine gewebespezifische Expression vermitteln, identifiziert und isoliert werden können. Die Gewebespezifität und Promotoraktivität dieser Sequenzen wurde dann in einem

transienten Transfektions-Assay in verschiedenen humanen Zelllinien getestet. Schließlich wurden geeignete Sequenzen ausgewählt, in einen Promotorkonversionsvektor (ProCon-Vektor) kloniert und dabei ihre Eignung zur Konstruktion gewebespezifischer Vektoren für die Gentherapie überprüft.

3. Ergebnisse

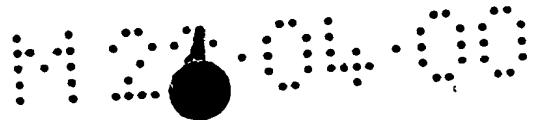
3.1 Analyse der HERV-Transkription in unterschiedlichen Zelltypen

Zur Untersuchung der HERV Transkription in unterschiedlichen Zellen wurde im ersten Schritt eine Methode (Reverse Dot-Blot Hybridisierung) eingesetzt, die ursprünglich zum Nachweis der HERV-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Bluts entwickelt worden war (Herrmann und Kalden, 1994). Dabei wurden klonierte und charakterisierte HERV *pol*-Genfragmente aus humaner genomischer DNA auf einer Membran fixiert und mit radioaktiven HERV-*pol* Gensonden hybridisiert. Die Sonden wurden mittels RT-PCR aus mRNA verschiedener Zellen unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide amplifiziert, die zu einem hochkonservierten Bereich retroviraler *pol*-Gene homolog sind (Shih *et al.*, 1989; Donehower *et al.*, 1990). Mit dieser Methode erhielten wir mit jeder bisher untersuchten Zelllinie ein charakteristisches Hybridisierungsmuster, was einen ersten Hinweis auf eine gewebespezifische Expression der HERV Elemente darstellte.

3.2 Isolierung von LTR U3-Regionen exprimierter HERVs

Die gewebespezifische Expression eines Retrovirus ist vor allem durch ihre U3-Region festgelegt. In diesem Bereich sind alle regulatorischen Sequenzen wie Promotor, Enhancer und die Bindungsstellen für verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren lokalisiert. Aus diesem Grund wurden Primer entwickelt, mit denen diese HERV-Sequenzen durch eine RT-PCR aus mRNA unterschiedlicher Zelllinien gezielt isoliert werden konnten (Tab. 2; Abb.1). Auf diese Weise wurden ca. 30 verschiedene HERV-LTRs kloniert. Ein Teil dieser Sequenzen wurde in einem Reporterplasmid auf Promotoraktivität und Gewebespezifität getestet.

Im ersten Ansatz wurde für die PCR ein polydT-Primer mit einem Primer kombiniert, der komplementär zum Polypurin Trakt (PPT) der retroviralen RNA ist (Abb.1). Der PPT-Trakt ist eine konservierte Region im nicht translatierten Bereich zwischen dem *env* Gen und der U3-Region der 3'-LTR. Die PPT-Region wird während der reversen Transkription des Retrovirus



3.3 Analyse der Expression von HERV-Promotoren in einem transienten Luziferase-Assay

Zur Analyse der Promotoraktivität und der Gewebespezifität der isolierten HERV-LTRs wurden diese zunächst in ein Luziferasereporterplasmid (pBL, Butz, K., DKFZ, Heidelberg) kloniert. Dieser Vektor enthält das *Photinus pyralis* Luziferasegen, fusioniert an das SV40 polyA Signal von pBLCAT2 (Hoppe-Seyler *et al.*, 1991).

Die einzelnen Vektorkonstrukte wurden transient in verschiedene Zelllinien transfiziert. Nach 48 h wurde die Luziferaseaktivität aus dem Zellysat mit dem Luziferase-Assay Kit von Promega gemessen und nach Abgleichen der β -Galaktosidaseaktivität bzw. der Renilla-Luziferaseaktivität als relative Luziferaseaktivität bestimmt. Die Promotoraktivitäten der LTRs wurden in Epithelzellen (HeLa, HaCaT), Fibroblastenzellen (LC5), T-Zellen (H9, HUT78), Gliomzellen (85HG66, U373), Leberzellen (Chang Liver), Pankreaszellen (MiaPaCa2, Panc1) und Brustkrebszelllinien (T47-D, MCF7) bestimmt.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2a – 2f dargestellt. Die HERV-H-H6 LTR besitzt demnach von allen untersuchten endogenen LTRs den stärksten Promotor. Die HERV-K LTR aus Plazenta ist in HeLa-Zellen besonders aktiv. In allen anderen Zelllinien ist diese LTR nur sehr schwach aktiv. Ebenfalls eine starke Aktivität in HeLa Zellen zeigte HERV-K-T47-D, diese LTR war auch in HaCat-Zellen und Pankreaszellen aktiv. Die HERV-L LTR besitzt in Leberzellen eine starke Promotoraktivität und ist in T-Zellen und Pankreaszellen schwach aktiv. Die HERV-T-S71A und HERV-E LTRs waren in keiner getesteten Zelllinie aktiv. Ebenso konnte bisher keinerlei Aktivität einer HERV-LTR in CML-Zellen beobachtet werden.

Die klonierten HERV-H LTRs (HERV-H1, HERV-H8, HERV-H13, HERV-H19, HERV-H-H6, Tab. 3) waren fast alle in 85HG66 Zellen aktiv, wobei HERV-H1 und HERV-H8 in dieser Zelllinie die höchste Aktivität zeigten (ohne Abb). HERV-H19 war in HeLa-Zellen sehr aktiv. Die HERV-HCM1 LTR zeigte in allen Zelllinien die höchste Promotoraktivität und war besonders in Lungenfibroblasten (LC5) aktiv (Abb. 3).

3.4 Konstruktion von HERV-Hybrid-Vektoren und Überprüfung der Aktivitäten von HERV- Promotoren in diesen Vektoren

Die Funktionsfähigkeit menschlicher endogener retroviraler LTR Sequenzen in retroviralen Vektoren wurde in zwei unterschiedlichen Promotorkonversionsvektoren (ProCon) ausgetestet. Dazu wurden hybride HERV/MLV Vektoren unter Verwendung zweier auf MLV basierender Vektoren pLESN-MMTV (Abb. 7) und pLX-MMTV (Abb. 8) konstruiert. Diese Vektoren enthalten das EGFP Gen als Reportergen, das von der 5' LTR (unterschiedlich, je nachdem ob vor oder nach der Promotorkonversion) aus exprimiert wird, sowie ein Neomycingen, das von einem SV40 Promotor aus exprimiert wird. Darüberhinaus enthält der Vektor pLX-MMTV einen prokaryotischen Replikationsorigin, der die Reklonierung des Provirus für weitere molekulare Charakterisierungen erlaubt.

Zur Konstruktion der HERV-Hybrid Vektoren wurde jeweils die MMTV-LTR durch die HERV-HCM1 LTR ersetzt (Abb. 7). Dazu wurde die LTR zunächst mittels PCR aus dem Vektor pBL-HERV-H mit spezifischen Primern amplifiziert, die zusätzliche Sequenzen für die Restriktionsenzyme MluI und SacII enthielten. Diese Fragmente wurden anschließend in die 3'U3 deletierten Vektoren eingebaut. Das Reportergen EGFP wird nach der Transfektion in die Verpackungszelllinie zunächst vom MLV Promotor aus exprimiert. (Abb 9a) Nach Infektion der Zielzellen und erfolgreicher Promotorkonversion durch die reverse Transkription in den Zielzellen liegt das Reportergen unter der Transkriptionskontrolle der HERV LTR vor.

Die HERV-Hybrid Vektorkonstrukte pLESN-HERV-H (Abb. 7) und pLX-HERV-H (Abb.8), sowie die Ursprungsvektoren pLESN-MMTV und pLX-MMTV wurden in die amphotrophe Verpackungszelllinie PA317 transfiziert. Die resultierenden retroviralen Vektorpartikel wurden anschließend benutzt, um die Zelllinien CrfK und LC5 zu infizieren.

Die infizierten Zelllinien wurden kloniert und die selektionierten Zellklone daraufhin untersucht, ob sie die Vektorkonstrukte enthielten und ob die Promotorkonversion stattgefunden hatte. Dazu wurde aus infizierten und nicht infizierten Zellen chromosomale DNA präpariert und mittels PCR analysiert. Die Primer wurden aus der MLV U3 (P5) und R (P2) Region sowie aus der HERV-H Region (P1) ausgesucht und in Kombination mit einem Primer aus der EGFP Region für eine PCR eingesetzt (Abb. 9a). Die PCR-Produkte wurden mit HERV-H spezifischen Sonden hybridisiert (Abb. 9b). Dabei ergab die DNA, die mit den pLX HERV-H Partikeln infiziert wurden, nach Amplifikation mit den Primern P1 und P3 ein PCR Produkt von 1,1 kb, das

als Primerbindungsstelle für die Synthese des Plus-Stranges genutzt (Sorge und Hughes, 1982).

Durch Datenbankanalysen wurden PPT-Sequenzen unterschiedlicher HERV-Familien identifiziert und durch Vergleich ihrer Homologien in verschiedene Gruppen eingeteilt. Aus den Konsensussequenzen der einzelnen Gruppen wurden Oligonukleotide als Primer für die RT-PCR synthetisiert. Die mRNA wurde aus verschiedenen Zelllinien präpariert: Epithelzellen (HeLa, HaCaT), Fibroblastenzellen (LC5), T-Zellen (H9, HUT78), Lymphoblasten (CML), Gliomzellen (85HG66, U373), Pancreaszellen (MiaPaCa2, Panc1), Leberzellen (Chang Liver) und Brustkrebszelllinien (T47-D, MCF7). Darüber hinaus wurden zusätzlich cDNA Genbanken (Clontech) verschiedener menschlicher Gewebe (Gehirn, Herz, Leber, Niere, Lunge, Pancreas, Plazenta, Skelettmuskel) für die RT-PCR eingesetzt.

Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend kloniert, sequenziert und mittels Datenbankvergleichen analysiert. Von den PCR-Fragmenten, die mit den PPT- und den polydT-Primern erhalten wurden, konnten zwei LTRs über Homologievergleiche der HERV-H und der HERV-K Familie zugeordnet werden. Durch die Verwendung von polydT-Primern in diesen PCR-Ansätzen wurden zahlreiche Sequenzen amplifiziert, die keine Homologien zu bekannten retroviralen LTRs und darüber hinaus auch keine Promotorstrukturelemente enthielten. Aus diesem Grund wurden weitere Sequenzen aus konservierten Bereichen der U3-Region und aus der R-Region von HERV-K und HERV-H Familien zur Primersynthese ausgesucht (Mold *et al.*, 1997), (Abb.1, Tab.1). Die resultierenden PCR-Produkte wurden nach Auftrennung im Agarosegel auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit Sonden hybridisiert, die aus den LTR-Regionen verschiedener HERV-LTRs (HERV-K-pl167, HERV-H-H6, HERV-E, HERV-L) präpariert wurden. Die hybridisierenden Fragmente wurden anschließend in einen Vektor (pZERO, Invitrogen) kloniert und sequenziert. Mit dieser Methode konnten verschiedene HERV-LTRs isoliert werden, die in Tabelle 3 aufgelistet sind.

Die HERV-K-LTRs, die aus menschlichem Gehirn und Herzgewebe sowie aus T47-D Zellen isoliert wurden, zeigen sehr hohe Sequenzhomologien zu der 3'LTR von HERV-K10. Die HERV-H LTRs zeigen dagegen sehr viel höhere Sequenzvariabilitäten. HERV-H31, HERV-H3, HERV-HCM1, HERV-HCM4, HERV-HMP23 sind homolog zu der von Mager *et al.* isolierten HERV-H-H6 LTR, die anderen HERV-H Sequenzen zeigen Homologien zu den von Anderssen *et al.* (1997) isolierten HERV-H LTRs aus Meerkatze, Krallenaaffe und Mensch.

mit der HERV-H-Sonde hybridisierte. Die Amplifikation mit den MLV U3 spezifischen Primern (P2/P3) ergab mit DNA von Zellen, die mit pLX und mit pLX HERV-H infiziert waren, PCR Produkte mit einer Größe von etwa 900 bp, die nicht mit der HERV-H Sonde hybridisierten. Aus der Amplifikation mit den MLV R Primern (P5/P3) wurde kein PCR-Produkt erhalten, das mit der HERV-H Sonde hybridisierte. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Promotorkonversion stattgefunden hat und der MLV Promotor der 5'LTR durch den HERV-Promotor ersetzt worden war.

Die Promotoraktivität der HERV LTR in den retroviralen Vektoren wurde nach Integration in die DNA der Zielzellen mittels FACS-Analysen über die Messung der EGFP Fluoreszenz bestimmt (Abb. 10). Die Aktivität des Ausgangsvektors pLX-MMTV wurde dabei mit dem HERV-Vektor pLX-HERV-H (H6) vor und nach Induktion mit Dexamethason verglichen. Der Vektor mit der MMTV LTR ist durch Dexamethason aktivierbar. Der Vektor mit der HERV LTR wird durch Dexamethason nicht aktiviert, er ist jedoch um etwa den Faktor 10 aktiver als der Dexamethason-stimulierte MMTV-Hybrid-Vektor.

3.5 Einfluß von Regulationselementen in R- und U5-Region auf die Promotoraktivität von HERV-Sequenzen.

Um auszutesten, welcher Sequenzbereich für einen funktionsfähigen HERV-Promotor erforderlich ist, wurde an einigen Beispielen der Einfluß von zusätzlichen LTR-Sequenzen, die außerhalb der U3-Region in der LTR lokalisiert sind, untersucht. Dazu wurde von 7 HERV-K LTRs (HERV-K-T47D, L5, L50, L8, L9, L48 und L20/49) die Aktivität der U3-Region mit der Aktivität der entsprechenden U3-R-Fragmente im Luziferase-Assay verglichen. Überraschenderweise zeigte sich, daß die verschiedenen R-Regionen den Promotor in der U3-Region sehr unterschiedlich beeinflussen können. Bei LTRs der Gruppe 1 (L5, L50, L8, L9) führt die Anwesenheit von R-Sequenzen in allen getesteten Zelllinien zu einem deutlichen Anstieg der Promotoraktivität (Abb. 4a). Bei LTRs der Gruppe 2 (L20/L49) hingegen wird die Aktivität des HERV-Promotors durch die R-Region reduziert (Abb. 4b). Der HERV-K-T47D-Promotor (Abb. 5) und der L48-Promotor (ohne Abbildung) werden durch die entsprechenden R-Sequenzen nicht wesentlich beeinflusst. Interessanterweise haben jedoch im Falle der HERV-K-T47D-LTR Sequenzbereiche, die downstream der U3-R-Region lokalisiert sind und die U5-Region, sowie den 3' nicht translatierten Bereich und den Beginn des gag-Gens umfassen, einen deutlich aktivierenden Effekt (Abb. 5).

Die Sequenzanalyse der verschiedenen getesteten R-Regionen zeigte, daß LTRs der Gruppe 1 in der R-Region eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP1 aufweisen, die in der R-Region der Gruppe 2 LTR fehlt (Abb. 6). Dagegen enthält die Gruppe 2 R-Region eine potentielle Bindungsstelle für den Faktor TFS3, der als Transkriptionsrepressor wirkt. Dies zeigt, daß die Aktivität von HERV-Promotoren durch den Einbau zusätzlicher Regulationselemente wie Transkriptionsfaktorbindungsstellen, Enhancer-Sequenzen oder negativ regulierende Elemente modifiziert werden kann.

5. Literatur

- Anderssen, S., Sjøttem, E., Svineng, G., Johansen, T. (1997). Comparative analyses of LTRs of the ERV-H family of primate-specific retrovirus-like elements isolated from marmoset, african green monkey, and man. *Virology* **234**. 14–30
- Di Christofano, A., Strazzullo, M., Longo, L., La Mantia, G. (1995). Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family. *Nucl. Acid. Res.* **23**. 2823–2830
- Donehower L. A., Bohannon, R. C., Ford, R. A. (1990). The use of primers from highly conserved *pol* regions to identify uncharacterized retroviruses by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **28**. 33–46
- Emmerman, M., Temin, M. H. (1986). Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. *Nucl. Acid. Res.* **14**. 9381–9396
- Feuchter, A., Mager, D. (1990). Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers. *Nucl. Acid. Res.* **18**. 1261–1270
- Feuchter-Murthy, A. E., Freeman, J. D., Mager, D. L. (1993). Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene. *Nucl. Acid. Res.* **21**. 135–143
- Goodchild N. L., Wilkinson, D. A., Mager, D. L. (1992). A human endogenous long terminal repeat provides a polyadenylation signal to a novel, alternatively spliced transcript in normal placenta. *Gene*, **121**. 287–294
- Herrmann, M., Kalden, J. R. (1994). PCR and reverse dot hybridisation for the detection of endogenous retroviral transcripts. *J. Virol. Methods* **46**. 333–348
- Hoppe-Seyler, F., Butz, K., zur Hausen, H. (1991). Repression of the Human Papillomavirus Type 18 Enhancer by the Cellular Transcription Factor Oct-1. *J. Virol.* **65**. 5613–5618
- Kato-N., Shimotohno, K., VanLeeuwen, D., Cohen, M. (1990). Human proviral mRNAs downregulated in choriocarcinoma encodes zinc finger protein related to Kruppel. *Mol. Cell. Biol.* **10**. 4401–4405
- Leib-Mösch, C., Haltmeier, M., Werner, T., Geigl, E.-M., Brack-Werner, R., Francke, U., Erfle, V., Hehlmann, R. (1993). Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* **18**. 261–269
- Mager, D. L. (1989). Polyadenylation Function and Sequence Variability of the Long Terminal Repeats of Human Endogenous Retrovirus-like Family RTVL-H. *Virology* **173**. 591–599
- Mold, D. E., Wu, T., Askin, F., Huang, R. C. (1997). Four classes of HERV-K long terminal repeats and their relative promoter strengths for transcription. *Biomed. Science* **4**. 78–82

- Price, J., Turner, D., Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**. 9237-9241
- Saller, R. M., Öztürk, F., Salmons, B., Günzburg, W. (1998). Construction and characterization of a hybrid mouse mammary tumor virus/murine leukemia virus-based retroviral vector. *J. Virol.* **2**. 1699-1703
- Salmons, B., Günzburg, W. H. (1993). Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Human Gene Therapy* **4**. 129-141
- Schulte, A. M., Lai, S., Kurtz, A., Czubyko, F., Riegel, A. T. (1996). Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**. 14759-14764
- Seifarth, W., Baust, C., Murr, A., Skladny, H., Krieg-Schneider, F., Blusch, J., Werner, T., Hehlmann, R., Leib-Mösch, C., (1998). Proviral Structure, chromosomal location and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47-D particles. *J. Virol.* **72**. *In press*
- Shih, A., Misra, R., Rush, M. G. (1989). Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses. *J. Virol.* **63**. 64-75
- Sorge, J., Hughes, S. H. (1982). Polypurine tract adjacent to the U₃ region of the Rous sarcoma virus genome provides a *cis*-acting function. *J. Virol.* **43**. 482-488
- Ting, C.-N., Rosenberg, M. P., Snow, C. M., Samuelson, L. C., Meisler, M. H. (1992). Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* **6**. 1457-1465
- Wilkinson, D. A., Mager, D. L., Leong, J.-A. (1994). Endogenous human retroviruses. In "The retroviridae" Vol. **3** (J. Levy, ed.), pp. 465-535, Plenum Press, NY.

Patience, C., Wilkinson, D. A., Weiss, R. A. (1997). Our retroviral heritage. *Trends Genet.* **13**, 116-120.

Patience, C., Takeuchi, Y., Cosset, F.-L., Weiss, R. A. (1998). Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J. Virol.* **72**, 2671-2676.

Tab. 3: Untersuchte HERV-LTRs

A: exprimierte HERV-LTRs aus verschiedenen Zelllinien und Geweben

	Primer	Herkunft	Homologie
HERV-K2	34/36	T47-D	HERV-K10, M12854, 97,9 %
HERV-K3	34/36	T47-D	HERV-K10, M12854, 98,4 %
HERV-K22	34/36	Gehirn	HERV-K10, M12854, 98,6 % *
HERV-K27	34/36	Gehirn	HERV-K10, M12854, 98,6 % *
HERV-K30	3/31	Herz	HERV-K10, M12854, 97,6 %
HERV-K32	34/36	Gehirn	HERV-K10, M12854, 98,6 % *
HERV-K45	34/36	Gehirn	HERV-K10, M12854, 98,6 % *
HERV-K-T47D-L5		T47-D	
HERV-K-T47D-L50		T47-D	
HERV-K-T47D-L8		T47-D	
HERV-K-T47D-L9		T47-D	
HERV-K-T47D-L48		T47-D	
HERV-K-T47D-L20		T47-D	
HERV-IP-T47D		T47-D	
HERV-H1	1/2	H6	Cercopithecus aethiops ERV-H; U96012, 87,1%
HERV-H8	1/2	HUT	HERV-H LTR18106, 84,8%
HERV-H13	1/2	HUT	HERV-H LTR18106, 91,8%
HERV-H19	1/2	Leber	Callithrix jacchus ERV-H, 5'LTR; U96052, 92,1%
HERV-H31	1/2	Leber	HERV-H(H6) x12717, 99,8%
HERV-H3	1/31	85HG66	HERV-H(H6) x12717, 100 %
HERV-H CM1	1/2	Chang Liver	HERV-H(H6) x12717, 100 %
HERV-H CM2	1/2	Chang Liver	HERV-H LTR18106, 84 %
HERV-H CM3	1/2	Chang Liver	Callithrix jacchus ERV-H, 5'LTR Silva 5, U96057, 84,2 %
HERV-H CM4	1/2	Chang Liver	HERV-H(H6) x12717, 100 %
HERV-H PA7	1/2	Panc1	Callithrix jacchus ERV-H, 5'LTR Silva 4, U96062, 85,7 %
HERV-H PA8	1/2	Panc1	Cercopithecus aethiops ERV-H, Vero 22, U96012, 87,1%
HERV-H PA9	1/2	Panc1	HERV-H LTR18106, 85 %
HERV-H PA10	1/2	Panc1	Callithrix jacchus ERV-H, 5'LTR Silva 4, U96062, 85,6 %
HERV-H MC14	1/2	MCF7	Cercopithecus aethiops ERV-H, Vero 22, U96012, 86,6%
HERV-H MC15	1/2	MCF7	Cercopithecus aethiops ERV-H, U96012, 86,6 %
HERV-H MC16	1/2	MCF7	Callithrix jacchus ERV-H, 5'LTR Silva 4, U96062, 87,4 %
HERV-H MC17	1/2	MCF7	Cercopithecus aethiops ERV-H, Vero 22, U96012, 86,6%
HERV-H MP20	1/2	MiaPaca	Human beta globin retrovirus-like repetitive elemen, k01891, 92,8 %
HERV-H MP21	1/2	MiaPaca	HERV-H LTR18106, 89,2 %
HERV-H MP 23	1/2	MiaPaca	HERV-H(H6) x12717, 99,5 %

B: bereits publizierte HERV-LTRs

	Größe (bp)	Referenz
HERV-K-pl167	970	Leib-Mösch <i>et al.</i> , 1993
HERV-K-T47-D	1200	Seifarth <i>et al.</i> , 1998
HERV-H-H6	393	Feuchter und Mager, 1990
HERV-T-S71A	625	Murr, Dissertation, 1998
HERV-E	391	Steele <i>et al.</i> , 1984
HERV-L	462	Cordonnier <i>et al.</i> , 1995

11-04-00



N 35-04-00

DIPL.-CHEM. DR. HORST REINHARD (-1998)
DIPL.-ING. UDO SKUHRA
DIPL.-ING. REINHARD WEISE
DIPL.-BIOL. DR. WERNER BEHNISCH
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER*
DIPL.-PHYS. DR. STEPHAN BARTH
DIPL.-ING./DIPL.-ING. GLYN CHARLES (DPA)

FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN

POSTF. / P.O.BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN

* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P11045
Dr.B/La

10. März 1999

Anmelder:

GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim

Auf HERV-LTR-Sequenzen basierende
retrovirale Expressionsvektoren

Patentansprüche

1. Retroviraler Expressionsvektor, enthaltend zumindest die nachfolgenden Elemente in funktioneller Anordnung:
 - a) DNA-Sequenzen zur Verpackung der Vektor-RNA und zur zellspezifischen Expression von Proteinen oder Peptiden, die von heterologen DNA-Nukleotidsequenzen kodiert werden;
 - b) ein oder mehrere für ein Protein oder Peptid kodierende DNA-Nukleotidsequenzen,

dadurch gekennzeichnet,

daß die DNA-Sequenzen zur zellspezifischen Expression eine zellspezifisch regulierbare Promotorregion aus einer humanen endogenen retroviralen DNA-Nukleotidsequenz (HERV) enthalten.

2. Expressionsvektor nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die DNA-Sequenzen zur zellspezifischen Expression aus dem LTR-Bereich und wahlweise dem nicht translatierten Bereich zwischen der 5' LTR und dem gag-Bereich von HERVs stammen.
3. Vektor nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der gesamte LTR-Bereich, der U3-Bereich oder der R- und U3-Bereich aus einer humanen endogenen retroviralen Nukleotidsequenz stammt.
4. Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für ein oder mehrere Proteine oder Peptide kodierende Nukleotidsequenzen ausgewählt werden aus einem oder mehreren Elementen der Gruppe, bestehend aus Markergenen, therapeutischen Genen, antiviralen Genen, Antitumorgenen und Zytokingenen.
5. Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
~~dadurch gekennzeichnet,~~
daß die zellspezifisch regulierbare Promotorregion aus dem LTR-Bereich einer zellspezifisch exprimierten endogenen humanen retroviralen Nukleotidsequenz stammt.
6. Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die humanen endogenen retroviralen zellspezifisch regulierbaren Promotorsequenzen ausgewählt werden aus einem oder mehreren Promotorsequenzen von HERV-Familien der Gruppe, bestehend aus HERV-K, HERV-H, HERV-E, HERV-

L, HERV-T, HERV-R, HERV-I, HERV-P, ERV9.

7. Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorregion neben der TATA-Box weitere Erkennungs- und Bindungsstellen für regulatorische Proteine umfaßt.
8. Vektor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungs- und Bindungsstellen für regulatorische Proteine die GC-Box, die CAAT-Box, Enhancersequenzen und Repressorsequenzen sowie Hormon-responsive Sequenzmotive umfassen und daß wahlweise zusätzlich Erkennungs- und Bindungsstellen für regulatorische Proteine aus der LTR-Region exogener Retroviren und/oder aus zellulären Genen enthalten sind.
9. Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Promotor-Konversionsvektor ist, umfassend einen 5' LTR-Abschnitt der Struktur U3-R-U5, ein oder mehrere Sequenzen, ausgewählt aus kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen, und einen 3' LTR-Abschnitt, umfassend einen teilweise oder vollständig deletierten U3-Abschnitt, wobei der deletierte U3-Abschnitt durch eine zellspezifisch regulierbare Promotorregion aus einer HERV-LTR-Sequenz ersetzt ist, gefolgt vom R-U5-Abschnitt.
- 10. ~~mRNA oder RNA eines retroviralen Expressionsvektors nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.~~
11. Prokaryontenzelle oder Eukaryontenzelle, enthaltend einen retroviralen Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.
12. Eukaryontenzelle, enthaltend einen retroviralen Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in integrierter Form.

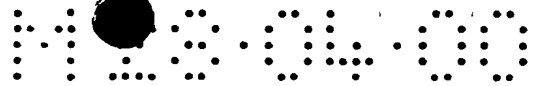
13. Verwendung eines zellspezifisch regulierbaren Promotorabschnitts aus einer humanen endogenen retroviralen DNA-Nukleotidsequenz zur Steuerung der Expression von Fremdgenen in retroviralen Expressionsvektoren, bevorzugt ProCon-Vektoren.
 14. Verwendung eines Expressionsvektors nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Expression von Fremdgenen in der Gentherapie.
 15. Virion, enthaltend eine retrovirale Expressionsvektor-RNA, abgeleitet von einer Expressionsvektor-DNA nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.
 16. Verfahren zur Herstellung eines Virions nach Anspruch 15 zum Einführen einer oder mehreren für ein Protein oder Peptid kodierender Nukleotidsequenzen,
dadurch gekennzeichnet,
daß der retrovirale Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in eine geeignete Verpackungszelllinie unter solchen Bedingungen eingebracht wird, daß das Virion ausgebildet wird und von der Verpackungszelllinie freigesetzt wird.
 17. Verfahren zum Einführen von Nukleotidsequenzen, die für ein oder mehrere Proteine oder Peptide kodieren, in eine Eukaryontenzelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Zelle mit einem Virion nach Anspruch 15 unter solchen Bedingungen infiziert wird, daß die für das Protein oder Peptid kodierende Nukleotidsequenzen in die chromosomale DNA der Eukaryontenzelle inseriert wird.
-
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Eukaryontenzelle eine Säugerzelle ist.
 19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Säugerzelle eine menschliche Zelle ist.

20. Retrovirales Vektorsystem, umfassend einen retroviralen Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche und eine Verpackungszelllinie mit zumindest einem retroviralen oder rekombinanten retroviralen Konstrukt, das für die Verpackungsproteine des retroviralen Expressionsvektors kodiert.
21. Retrovirales Vektorsystem nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Verpackungszelllinie retrovirale oder rekombinante retrovirale Konstrukte enthält, die für solche retroviralen Proteine kodieren, die vom retroviralen Expressionsvektor nicht kodiert werden.

Anhang:

HERV-LTR-Sequenzen

	1					50
HERV-H31	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CATATCCCCT	GTGACCTGCA	
HERV-H CM2	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCCAGGCCAT	CGCATCCCCT	GTGACTTGCA	
HERV-H H13	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CATATCCCCA	GGGACCTGCA	
HERV-H 19	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CATATCCCCT	GCGACCTGCA	
HERV-H MP20	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CATATCCCCT	GTGACCTGCA	
HERV-H CM1	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCCAAGCCAT	CGCATCCCCT	GTGACTTGCA	
HERV-H CM3	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCCAAGCCAT	CGCATCCCCT	GTGACTTGCA	
HERV-H MC16	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GC.....CTGCA	
HERV-H MP23	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCCAAGCCAT	CGCATCCCCT	GTGACTTGCA	
HERV-H1	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CAAATCCCCT	GTGACCTGCA	
HERV-H8	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CATATCCC..	GTGACCTGCA	
HERV-H PA7	TGTCAGGCCT	CTGAGCCCAA	GCTAAGCCAT	CAAATCCCCT	GTGACCTACA	
	51					100
HERV-H31	CGTATACATC	CAGATAGCC.TGAAG	CAACTGTA..	
HERV-H CM2	CGTATACATC	CAGATGGCC.TAAAG	TAAGTGAAGATCCA	
HERV-H H13	CGTATACATC	CAGATGGCC.TGAAG	CAACTGAAGATCCA	
HERV-H 19	CATATACATC	CAGATGGCC.TGAAG	TAAGTGAAGAATCA	
HERV-H MP20	CGTACACATC	CAGATGGCCG	GTTCTGCT	TAAGTGAAGA	CATTCCACCA	
HERV-H CM1	CGTATACGCC	CAGATGGCC.TGAAG	TAAGTGAAGAATCA	
HERV-H CM3	CGTGTATGCC	CAGATGGCC.TGAAG	TAAGTGAAGAATCA	
HERV-H MC16	CGTATACATC	CAGATG....AAG	CAAGTGAAGAATCA	
HERV-H MP23	CGTATACGCC	CAGATGGCC.TGAAG	TAAGTGAAGAATCA	
HERV-H1	CGTGTACATC	CAGATGACC.TGAAG	CAACTGAAGATCCA	
HERV-H8 ..	TATACATC	CAGATGGCC.TGAAG	CAACTGAAGATCCA	
HERV-H PA7	CGTGTACATC	CAGATGACC.TGAAG	CAACTGAAGATCCA	
	101					150
HERV-H31AAAATATCC	TTAACTGATG	ACA.TT....CCAATA	
HERV-H CM2	CAAAAGAAGT	AAAACAGCC	TTAACTGATG	ACA.TT....CCAACA	
HERV-H H13	CAAAGGAAGT	GAAAATAGCC	TTAACTGATG	ACA.TT....CCACCA	
HERV-H 19	CAAAAGAAGT	GAAAATGGCC	TGTTCC....T.....	
HERV-H MP20	CGAAAGAAGT	GAAAATGACC	TGTTCC....T.....	
HERV-H CM1	CAAAAGAAGT	GAAAAGGCC	TGCCCCGCCT	TAAGTGAAGA	CATTCCACCA	
HERV-H CM3	CAAAAGAAGT	GAAAAGGCC	TGCCCC....	
HERV-H MC16	CAAAAGAAGT	GAAAATGGCC	GTTTCC....T.....	
HERV-H MP23	CAAAAGAAGT	GAAAAGGCC	TGCCCCGCCT	TAAGTGAAGA	CATTCCACCA	
HERV-H1	CAAAAGAAGT	GAAAGTAGCC	TTAACTGATG	ACA.TT....CCACCA	
HERV-H8	CAAAGGAAGT	GAAAATAGCC	TTAACTGATG	ACA.TT....CCACCA	
HERV-H PA7	CAAAAGAAGT	GAAAGTAGCC	TTAACTGATG	ACA.TT....CCACCA	



	151				200
HERV-H31	TTGTGATTTG	TTTCTGCCCT	ACCCTGACTG	ATCAATGTGC	TTTGTAACTCT
HERV-H CM2	TTGTGATTTG	TTCTTGCCCC	ACCCTAACTG	ATAAATGTAC	TTTGTAACTCT
HERV-H H13	TTGTGATTTG	TTTCTTGCCCC	ATCCTAACTG	ATCAATGTAC	TTTGTAACTCT
HERV-H 19	GCCTTAACTG	ATGACATTAC	CTTGTGAAAT
HERV-H MP20	GCCTTAACTG	ATGACATTGT	CTTGTGAAAT
HERV-H CM1	TGGTGATTTG	TTCTTGCCCC	ACCTTAACTG	AGTGATTAAC	CCTGTGAATT
HERV-H CM3	ACCTTAACTG	AGTGATTAAC	CCCATGAATT
HERV-H MC16	GCCTTAACTG	ATGACATTAC	CTTGTGAAAT
HERV-H MP23	TGGTGATTTG	TTCTTGCCCC	ACCTTAACTG	AGTGATTAAC	CCTGTGAATT
HERV-H1	TTGTGATTTG	TTCTTGCCCC	ACGCTAACTG	AT.....AC	CATATATTCT
HERV-H8	TTGTGATTTG	TTCTTGCCCC	ACGCTAACTG	AT.....AC	CATATATTCT
HERV-H PA7	TTGTGATTTG	TTCTTGCCCC	ACGCTAGCTG	AT.....AC	CATATATTCT

	201				250
HERV-H31	CCCCCACCCT	TCAGAAGGCT	CTTTGTAATC	CTCCCCACCC	TTGAGAATGG
HERV-H CM2	CCCCCACCCT	TAAGAAGGTC	CTTTGTAATT	CTCCCCACCC	TTGAGAGTGT
HERV-H H13	CTCCCCACCCT	TAAGAAGGTT	CTTTGTAATT	CTCCCCACCC	TTGAGAGTGT
HERV-H 19	TCCTTCTCCT	GGCTCATCCT	GGCTCAAAAG	CTC...CCGCA	CTGAG....C
HERV-H MP20	TCCTCCTCCT	GGCTCATCCT	GGCTCAAAAG	CTC...CCCGA	CTGAG....T
HERV-H CM1	TGCTTCTCCT	GGCTCAG...AAG	CTC...CCCCA	CTGAG....C
HERV-H CM3	TCCTTCCCCCT	GGCTCAG...AAG	CTC...CCCCA	CTGAG....C
HERV-H MC16	TCCTTCTCCT	GGCTCAG...AAG	CTC...CCCCA	CTGAG....C
HERV-H MP23	TGCTTCTCCT	GGCTCAG...AAG	CTC...CCCCA	CTGAG....C
HERV-H1	TCCCC.....CGCCC	TTGAGAATGT
HERV-H8	TCCCC.....CGCCC	TTGAGAATGT
HERV-H PA7	TCCCC.....CGCCC	TTGAGAATGT

	251				300
HERV-H31	ACTTGGTGAG	ATCCACCCCC	TGCCTGCAAA	GCATTGCCCC	TAACTCCACC
HERV-H CM2	ACTTTGTGAG	ATCCACACCT	GCCCACCAGA	GAACAAACCC	CCTTTGACTG
HERV-H H13	ACTTTGTGAG	ATCCACCCCC	TGCCGGCAAA	ACATTGCTCC	TAACCCAACC
HERV-H 19	ACCTTGTGAC	CCCTGCCTCT	GCCCGCCAGA	GAGCAACCCC	CTCTTGACTG
HERV-H MP20	ACATTGTGAC	CCCCACTCCT	GCCCGCCAGA	GAACAGCCCC	CT.TTGACTG
HERV-H CM1	ACCTTGTGAC	CCCCGCCCCCT	GCCCACCAGA	GAACAACCCC	CT.TTGACTG
HERV-H CM3	ACCTTGTGAC	CCCTGCCCCCT	GCCCACCAGA	GAACAACCCC	CT.TTGACTG
HERV-H MC16	ACCTTGTGAC	CCCCACTCCT	CCCCGCCACA	GAACAACCCC	CT.TTGACTG
HERV-H MP23	ACCTTGTGAC	CCCCGCCCCCT	GCCCACCAGA	GAACAGACCC	CT.TTGACTG
HERV-H1	ACTTTGTA..C
HERV-H8	ACTTTGTA..C
HERV-H PA7	ACTTTGTA..C

	301				350
HERV-H31	GCCTGTCCCA	AAACCTATGA	GAA.CTAATG	ATA.....	ATCCC.ACCA
HERV-H CM2	TAATTTTCCA	TTACCTTCCC	TAATCCTATA	AAACGGCCCC	ACCCC.ATCT
HERV-H H13	GCCTA.CCCC	AAACCTGTAA	GAA.CTAATG	ATA.....	ATCC..ACCA
HERV-H 19	TAATTTTCCT	TTACCTACCT	AAATCCTATA	AAATGGCCCC	ACTCCTATCT
HERV-H MP20	TAATTTTCCT	TTATCTACCC	AAATCCTATA	AAACAGCCCC	ACCTTTATCT
HERV-H CM1	TAATTTTCCA	TTACCTTCCC	AAATCCTATA	AAACGGCCCC	ACCCCTATCT
HERV-H CM3	TAATTTTCCA	TTACTTTCCC	AAATCCTATA	AAACGGCCCC	ACCCCTATCT
HERV-H MC16	TAATTTTCCA	CTGCCCCGCC	AAACCCTATA	AAACGGTCCC	ACCCC.ATCT
HERV-H MP23	TAATTTTCCA	TTACCTTCCC	AAATCCTATA	AAACGGCCCC	ACCCCTATCT
HERV-H1	ACCTATCCC.	AAACCTATAA	GAA.CTAATG	ATA.....	ATCCT.ACCA
HERV-H8	ACCTATCCC.	AAACCTATAA	GAA.CTAATG	ATA.....	ATCC..ACCA
HERV-H PA7	ACCTATCCC.	AAACCTATAA	GAA.CTAATG	ATA.....	ATCCT.ACCA

1250400

351

400

HERV-H31	CAC	TTTGCTG	ACTCTCTTTC	C...	AGACTC	AGCCCGGCTG	CACCCAGGTG
HERV-H CM2	CC	TTTGCTG	ACTCTCTTTT	C...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG
HERV-H H13	CC	TTTGCTG	ACTC..TTTT	C...	AGAATC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG
HERV-H 19	CC	TTTCGCTG	ACTCTCTTTT	C...	GGACTC	AGCCCGCCTG	TACCCAGGTG
HERV-H MP20	CC	TTGGCTG	ACTCTCTTTT	C...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG
HERV-H CM1	CC	TTTCGCTG	ACTCTCTTTT	C...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CCCCCAGGTG
HERV-H CM3	CC	TTTCGCTG	ACTCTCTTTT	C...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG
HERV-H MC16	CC	TTCCCTG	ACTCTCTTTT	CTTCGGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG	
HERV-H MP23	CC	TTTCGCTG	ACTCTCTTTT	C...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CCCCCAGGTG
HERV-H1	CC	TTTGCTG	ACTCTCTTTT	T...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG
HERV-H8	CC	TTTGCTG	ACTCTCTTTT	T...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG
HERV-H PA7	CC	TTTGCTG	ACTCTCTTTT	T...	GGACTC	AGCCCGCCTG	CACCCAGGTG

401

425

HERV-H31	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H CM2	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H H13	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H 19	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H MP20	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H CM1	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H CM3	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H MC16	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H MP23	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H1	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H8	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT
HERV-H PA7	AAATAAACAG	CCATGTTGCT	CACAT

HERV-K45 GCGACCGGT: GGATC:CCGG GCCCGCGG:T ACCGTCGACT :GCAGAATTC
 HERV-K27 GCGACCGGT: GGATC:CCGG GCCCGCGG:T ACCGTCGACT :GCAGAATTC
 HERV-K2 GCGACCGGT: GGATC:CCGG GCCCGCGG:T ACCGTCGACT :GCAGAATTC
 HERV-K1 GCGACCGGT: GGATC:CCGG GCCCGCGG:T ACCGTCGACT :GCAGAATTC
 HERV-K30 GTC CCACCTCCAG CCCTAAGGCG GTTTTTCCT ATCTCAGTAG
 HERV-K10 AGTAG
 #1

HERV-K45 ATGGAGCATA CAATCGGGTT TTATACCGAG ACATTCCATT GCCCAGGGAC
 HERV-K27 ATGGAGCATA CAATCGGGTT TTATACCGAG ACATTCCATT GCCCAGGGAC
 HERV-K2 ATGGAGCATA CAATCGGGTT TTATACCGAG ACATTCCATT GCCCAGGGAC
 HERV-K1 ATGGAGCATA CAATCGGGTT TTATACCGAG ACATTCCATT GCCCAGGGAC
 HERV-K30 ATGGAGCATA CAATCGGGTT TTATACCGAG ACATTCCATT GCCCAGGGAC
 HERV-K10 ATGGAGCATA CAATCGGGTT TTATACCGAG ACATTCCATT GCCCAGGGAC
 #51

HERV-K45 AGGCAGGAGA CAGATGCCTT CCTCTTGTCT CAACTGCAAG AGGCATTCTT
 HERV-K27 AGGCAGGAGA CAGATGCCTT CCTCTTGTCT CAACTGCAAG AGGCATTCTT
 HERV-K2 AGGCAGGAGA CAGATGCCTT CCTCTTGTCT CAACTGCAAG AGGCATTCTT
 HERV-K1 AGGCAGGAGA CAGATGCCTT CCTCTTGTCT CAACTGCAAG AGGCATTCTT
 HERV-K30 AGGCAGGAGA CAGATGCCTT CCTCTTGTCT CAACTGCAAG AGGCATTCTT
 HERV-K10 AGGCAGGAGA CAGATGCCTT CCTCTTGTCT CAACTGCAAG AGGCATTCTT
 #101

HERV-K45 TCCTCTTATA CTAATCCTCC TCAGCACAGA CCCTTTACGG GTGTCGGGCT
 HERV-K27 TCCTCTTATA CTAATCCTCC TCAGCACAGA CCCTTTACGG GTGTCGGGCT
 HERV-K2 TCCTCTTATA CTAATCCTCC TCAGCACAGA CCCTTTACGG GTGTCGGGCT
 HERV-K1 TCCTCTTATA CTAATCCTCC TCAGCACAGA CCCTTTACGG GTGTCGGGCT
 HERV-K30 TCCTCTTATA CTAATCCTCC TCAGCACAGA CCCTTTACGG GTGTCGGGCT
 HERV-K10 TCCTCTTTTA CTAATCCTCC TCAGCACAGA CCCTTTACAG GTGTCGGGCT
 #151

HERV-K45 GGGGGACGGT CAGGTCTTTC CCTTCCCACG AGGCCATATT TCAGACTATC
 HERV-K27 GGGGGACGGT CAGGTCTTTC CCTTCCCACG AGGCCATATT TCAGACTATC
 HERV-K2 GGGGGATGGT CAGGTCTTTC CCTTCCCACG AGGCCATATT TCAGACTATC
 HERV-K1 GGGGGACGGT CAGGTCTTTC CCTTCCCACG AGGCCATATT TCAGACTATC
 HERV-K30 GGGGGACGGT CAGGTCTTTC CCTTCCCACG AGGCCATATT TCAGACTATC
 HERV-K10 GGGGGACGGT CAGGTCTTTC CCTTCCCACG AGGCCATATT TCAGACTATC
 #201

HERV-K45 ACATGGGGAG AAACCTTGGA CAATACCTGG CTTTCCTAGG CAGAGGTCCC
 HERV-K27 ACATGGGGAG AAACCTTGGA CAATACCTGG CTTTCCTAGG CAGAGGTCCC
 HERV-K2 ACATGGGAAG AAACCTTGGA CAATACCTGG CTTTCCTAGG CAGAGGTCCC
 HERV-K1 ACATGGGGAG AAACCTTGGA CAATACCTGG CTTTCCTAGG CAGAGGTCCC
 HERV-K30 ACATGGGGAG AAACCTTGGA CAATACCTGG CTTTCCTAGG CAGAGGTCCC
 HERV-K10 ACATGGGGAG AAACCTTGGA CAATACCTGG CTTTCCTAGG CAGAGGTCCC
 #251

HERV-K45 TGCGGCCTTC CGCAGTTTTT GTGT:CCTGG GTACTTGAGA TTAGGGAGTG
 HERV-K27 TGCGGCCTTC CGCAGTTTTT GTGT:CCTGG GTACTTGAGA TTAGGGAGTG
 HERV-K2 TGCGGCCTTC CGCAGTTTTT GTGT:CCTGG GTACTTGAGA TTAGGGAGTG
 HERV-K1 TGCGGCCTTC CGCAGTTTTT GTGT:CCTGG GTACTTGAGA TTAGGGAGTG
 HERV-K30 TGCGGCCTTC CGCAGTTTTT GTGTCC:TGG GTACTTGAGA TTAGGGAGTG
 HERV-K10 TGCGGCCTTC TGCAGTTTTT GTGTCCCTGG GTACTTGAGA TTAGGGAGTG
 #301

HERV-K45	GTGATGACTC	TTAAGGAGCA	TGCTGCCTTC	AAGCATCTGT	TTAACAAAGC
HERV-K27	GTGATGACTC	TTAAGGAGCA	TGCTGCCTTC	AAGCATCTGT	TTAACAAAGC
HERV-K2	GTGATGACTC	TTAAGGAGCA	TGCTGCCTTC	AAGCATCTGT	TTAACAAAGC
HERV-K1	GTGATGACTC	TTAAGGAGCA	TGCTGCCTTC	AAGCATCTGT	TTAACAAAGC
HERV-K30	GTGATGACTC	TTAAGGAGCA	TGCTGCCTTC	AAGCATCTGT	TTAACAAGGC
HERV-K10	GTGATGACTC	TTAAGGAGCA	TGCTGCCTTC	AAGCATCTGT	TTAACAAAGC
#351				

HERV-K45	ACATCCTGCA	CCGCCCTTAA	TCCATTCAAC	CCTGAGTTGA	CACAGCACAC
HERV-K27	ACATCCTGCA	CCGCCCTTAA	TCCATTCAAC	CCTGAGTTGA	CACAGCACAC
HERV-K2	ACATCCTGCA	CTGCCCTTAA	TCCATTCAAC	CCTGAGTTGA	CACAGCGCAC
HERV-K1	ACATCCTGCA	CCGCCCTTAA	TCCATTCAAC	CCTGAGTTGA	CACAGCACAC
HERV-K30	ACATCCTGCA	CCGCCCTTAA	TCCATTCAAC	CCTGAGTTGA	CACAGCACAC
HERV-K10	ACATCCTGCA	CCGCCCTTAA	TCCATTCAAC	CCTGAGTTGA	CACAGCACAT
#401				

HERV-K45	GTTTCAGAGA	GCACGGGGTT	GGGGGTAAGG	TCATAGATTA	ACAGAATCTC
HERV-K27	GTTTCAGAGA	GCACGGGGTT	GGGGGTAAGG	TCATAGATTA	ACAGAATCTC
HERV-K2	GTTTCAGAGA	GCACGGGGTT	GGGGGTAAGG	TCATAGATTA	ACAGAATCTC
HERV-K1	GTTTCAGAGA	GCACGGGGTT	GGGGGTAAGG	TCATAGATTA	ACAGAATCTC
HERV-K30	GTTTCAGAGA	GCACGGGGTT	GGGGGTAAGG	TCATAGATTA	ACAGAATCTC
HERV-K10	GTTTCAGAGA	GCACGGGGTT	GGGGGTAAGG	TCATAGATTA	ACAGAATCTC
#451				

HERV-K45	AAGGCAGAAG	AATTTTCTT	AACACATAAC	AAAATGGAGT	CTCCCATGTC
HERV-K27	AAGGCAGAAG	AATTTTCTT	AACACATAAC	AAAATGGAGT	CTCCCATGTC
HERV-K2	AAGGCAGAAG	AATTTTCTT	AACACATAAC	AAAATGGAGT	CTCCCATGTC
HERV-K1	AAGGCAGAAG	AATTTTCTT	AACACATAAC	AAAATGGAGT	CTCCCATGTC
HERV-K30	AAGGCAGAAG	AATTTTCTT	AACACATAAC	AAAATGGAGT	CTCCCATGTC
HERV-K10	AAGGCAGAAG	AATTTTCTT	AGCACATAAC	AAAATGGAGT	CTCCTATGTC
#501				

HERV-K45	TACTTCTTTC	TACACAGACA	CAGTAACAAT	CTGATCTCTC	TTGCTTTTCC
HERV-K27	TACTTCTTTC	TACACAGACA	CAGTAACAAT	CTGATCTCTC	TTGCTTTTCC
HERV-K2	TACTTCTTTC	TACACAGACA	CAGTAACAAT	CTGATCTCTC	TTGCTTTTCC
HERV-K1	TACTTCTTTC	TACACAGACA	CAGTAACAAT	CTGATCTCTC	TTGCTTTTCC
HERV-K30	TACTTCTTTC	TACACAGACA	CAGTAACAAT	CTGATCCCTC	TTGCTTTTCC
HERV-K10	TACTTCTTTC	TACACAGACA	CAGTAACAAT	TTGATCTCTC	TTGCTTTTCC
#551				

HERV-K45	CCACATTTCC	CCCTTTTCTT	TTCG		
HERV-K27	CCACATTTCC	CCCTTTTCTT	TTCGA		
HERV-K2	CCACATTTCC	CCCTTTTCTT	TTCGACAAA		
HERV-K1	CCACATTTCC	CCCTTTTCTT	TTCGACAAAA	CCGCCAT:CT	CGAGATC:TG
HERV-K30	CCACATTTCC	CCCTTTTCTT	ATCCATCACA	CTGGCGGCCG	CTCGAGCATG
HERV-K10	CCACATTTCC	CCCTTTTCTT	TTCGACAAAA	CCGCCATC	
#601				

HERV-K1	AGT				
HERV-K30	CATCTAGAGG	GCCCAATTCTG	CCCTATAGTG		
#651				

U3

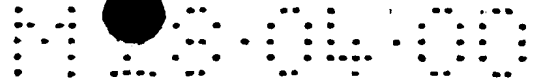
IR
TCGCGCGAAGGATTACCCAGGTGTCGAGGCAAGAGACTGAAGGCACAAACTGTTTCAGTATTAATATAGAAAATAGCTAGAATAGATTATTAAATAAAATTAGTATATACACATGAT
A.....A.A.---G.....C.....C.....T.GAG...
T.G.G.T...C.....A.....A.A.---G.....C.....T.GAG...
T.G.G.T...C.....A.....A.G.---G.T.G.....C.....T.GAG...
T.G.G.T...C.....A.....A.G.---G.T.G.....C.....T.GAG...
T.G.G.T...C.....A.....A.G.---G.....C.....C.GCG...
C.G.A.G.T...G.....A.G.---G.....A.T.A.....T.....T.GAG...
C.A.A.T...T...G.....A.G.....A.T.A.....T.....T.GAG...

CATGGACA-TTTACCAATCATTTACTTACAAACATTTGTTAAATCATTAGCTTTTAAATTATTACTCTCTTTGTTTATTACTAAATAAACCAAGGAATAACCCGGTAG-CATACGGTCAGGTCGTCTGAAG
 .G.A.G.A.C-----A..T..GCA.C..T..TG.GT..G...C...AG
 .G.A.G.A.C-----A..T..GCA.C..T..TG.GT..G...C...AG
 .G.A.T.A.T.T..T..A..A..GCA.C..T..TG.GT..G...C...AG
 .G.A.T.A.T.T..T..A..A..GCA.C..T..TG.GT..G...C...AG
 .G.A.T.C.T.T..T..A..A..GCA.A..T..CA.GT..G...C...AG
 .G.A.T.A.T.T..T..A..A..GCT.C..T..TG.GT..G...T...CG

GCACATTGTGACAGATGACCTTAGAAGCCAGAGAGGTGACCTTCTGTGTCAGCCTGCAATTAGAGCAGAGCTTGAGGGCTCTTGCTCAAGCTGTATACACAGATGCTCTGGGAAGGCACC-GTTAT

[illegible]

HERV-IP-T47D



---	LTR	c/EBP	GFI-1	AP-1	AP-1	120
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31	32	33	34	35
36	37	38	39	40	41	42
43	44	45	46	47	48	49
50	51	52	53	54	55	56
57	58	59	60	61	62	63
64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77
78	79	80	81	82	83	84
85	86	87	88	89	90	91
92	93	94	95	96	97	98
99	100	101	102	103	104	105
106	107	108	109	110	111	112
113	114	115	116	117	118	119
120	121	122	123	124	125	126
127	128	129	130	131	132	133
134	135	136	137	138	139	140
141	142	143	144	145	146	147
148	149	150	151	152	153	154
155	156	157	158	159	160	161
162	163	164	165	166	167	168
169	170	171	172	173	174	175
176	177	178	179	180	181	182
183	184	185	186	187	188	189
190	191	192	193	194	195	196
197	198	199	200	201	202	203
204	205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216	217
218	219	220	221	222	223	224
225	226	227	228	229	230	231
232	233	234	235	236	237	238
239	240	241	242	243	244	245
246	247	248	249	250	251	252
253	254	255	256	257	258	259
260	261	262	263	264	265	266
267	268	269	270	271	272	273
274	275	276	277	278	279	280
281	282	283	284	285	286	287
288	289	290	291	292	293	294
295	296	297	298	299	300	301
302	303	304	305	306	307	308
309	310	311	312	313	314	315
316	317	318	319	320	321	322
323	324	325	326	327	328	329
330	331	332	333	334	335	336
337	338	339	340	341	342	343
344	345	346	347	348	349	350
351	352	353	354	355	356	357
358	359	360	361	362	363	364
365	366	367	368	369	370	371
372	373	374	375	376	377	378
379	380	381	382	383	384	385
386	387	388	389	390	391	392
393	394	395	396	397	398	399
400	401	402	403	404	405	406
407	408	409	410	411	412	413
414	415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426	427
428	429	430	431	432	433	434
435	436	437	438	439	440	441
442	443	444	445	446	447	448
449	450	451	452	453	454	455
456	457	458	459	460	461	462
463	464	465	466	467	468	469
470	471	472	473	474	475	476
477	478	479	480	481	482	483
484	485	486	487	488	489	490
491	492	493	494	495	496	497
498	499	500	501	502	503	504
505	506	507	508	509	510	511
512	513	514	515	516	517	518
519	520	521	522	523	524	525
526	527	528	529	530	531	532
533	534	535	536	537	538	539
540	541	542	543	544	545	546
547	548	549	550	551	552	553
554	555	556	557	558	559	560
561	562	563	564	565	566	567
568	569	570	571	572	573	574
575	576	577	578	579	580	581
582	583	584	585	586	587	588
589	590	591	592	593	594	595
596	597	598	599	600	601	602
603	604	605	606	607	608	609
610	611	612	613	614	615	616
617	618	619	620	621	622	623
624	625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636	637
638	639	640	641	642	643	644
645	646	647	648	649	650	651
652	653	654	655	656	657	658
659	660	661	662	663	664	665
666	667	668	669	670	671	672
673	674	675	676	677	678	679
680	681	682	683	684	685	686
687	688	689	690	691	692	693
694	695	696	697	698	699	700
701	702	703	704	705	706	707
708	709	710	711	712	713	714
715	716	717	718	719	720	721
722	723	724	725	726	727	728
729	730	731	732	733	734	735
736	737	738	739	740	741	742
743	744	745	746	747	748	749
750	751	752	753	754	755	756
757	758	759	760	761	762	763
764	765	766	767	768	769	770
771	772	773	774	775	776	777
778	779	780	781	782	783	784
785	786	787	788	789	790	791
792	793	794	795	796	797	798
799	800	801	802	803	804	805
806	807	808	809	810	811	812
813	814	815	816	817	818	819
820	821	822	823	824	825	826
827	828	829	830	831	832	833
834	835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846	847
848	849	850	851	852	853	854
855	856	857	858	859	860	861
862	863	864	865	866	867	868
869	870	871	872	873	874	875
876	877	878	879	880	881	882
883	884	885	886	887	888	889
890	891	892	893	894	895	896
897	898	899	900	901	902	903
904	905	906	907	908	909	910
911	912	913	914	915	916	917
918	919	920	921	922	923	924
925	926	927	928	929	930	931
932	933	934	935	936	937	938
939	940	941	942	943	944	945
946	947	948	949	950	951	952
953	954	955	956	957	958	959
960	961	962	963	964	965	966
967	968	969	970	971	972	973
974	975	976	977	978	979	980
981	982	983	984	985	986	987
988	989	990	991	992	993	994
995	996	997	998	999	1000	1001

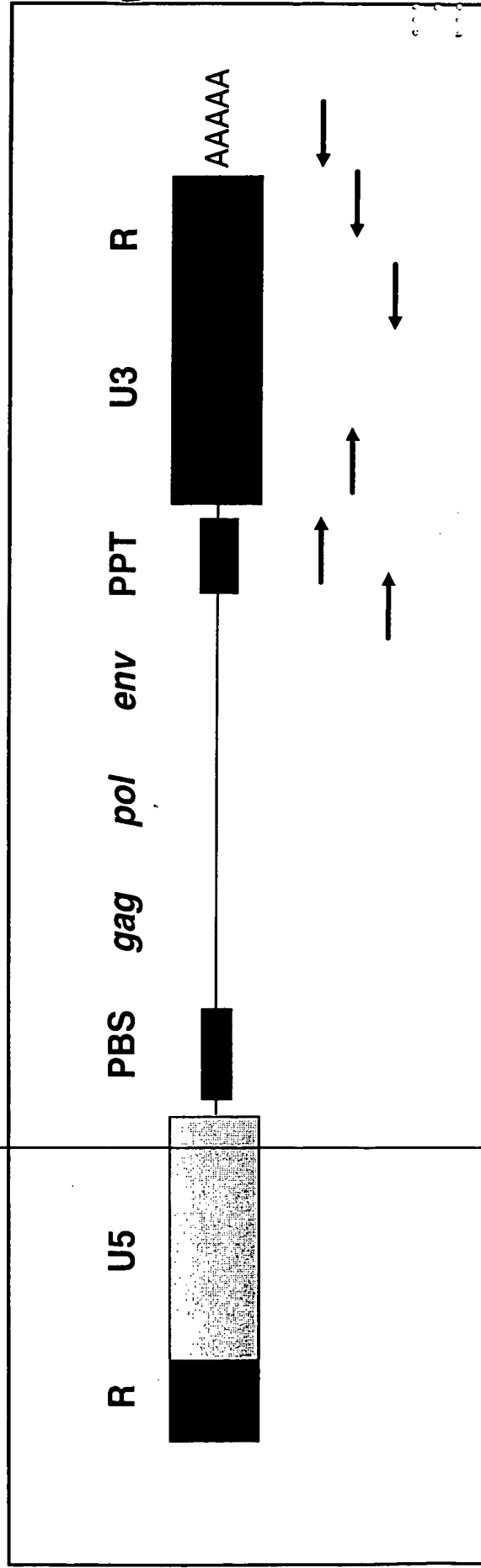


Abb.1: RT-PCR Strategie zur Isolierung von U3-Regionen transkribierter HERV-Sequenzen

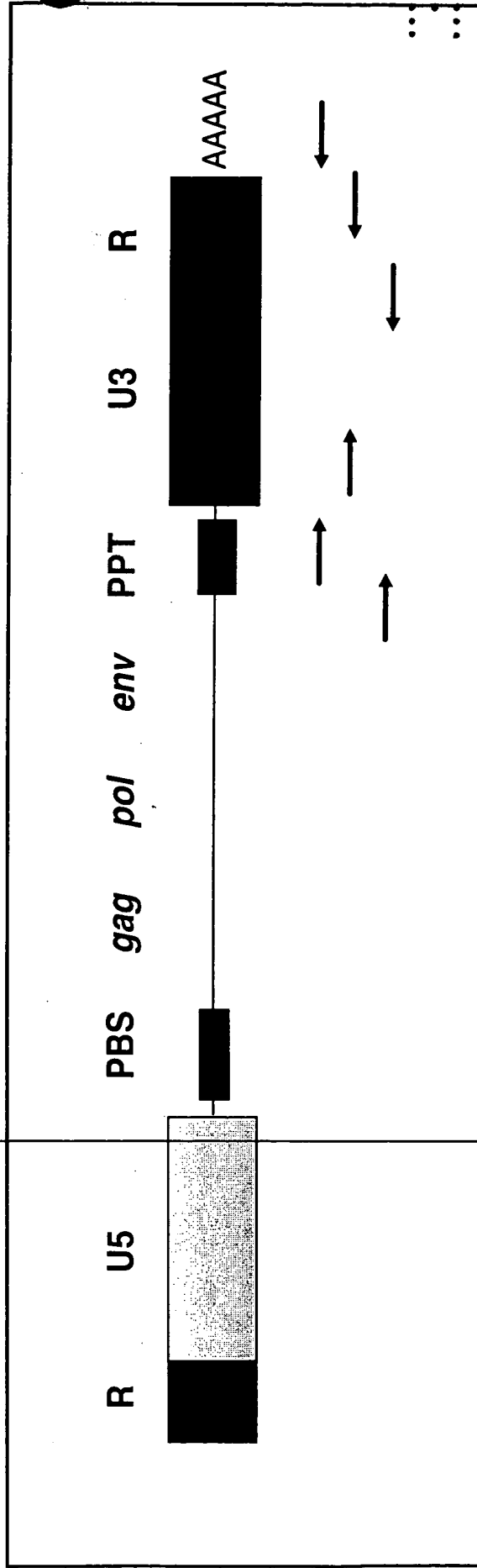


Abb.1: RT-PCR Strategie zur Isolierung von U3-Regionen transkribierter HERV-Sequenzen

HERV-H-H6

Abb.2a)

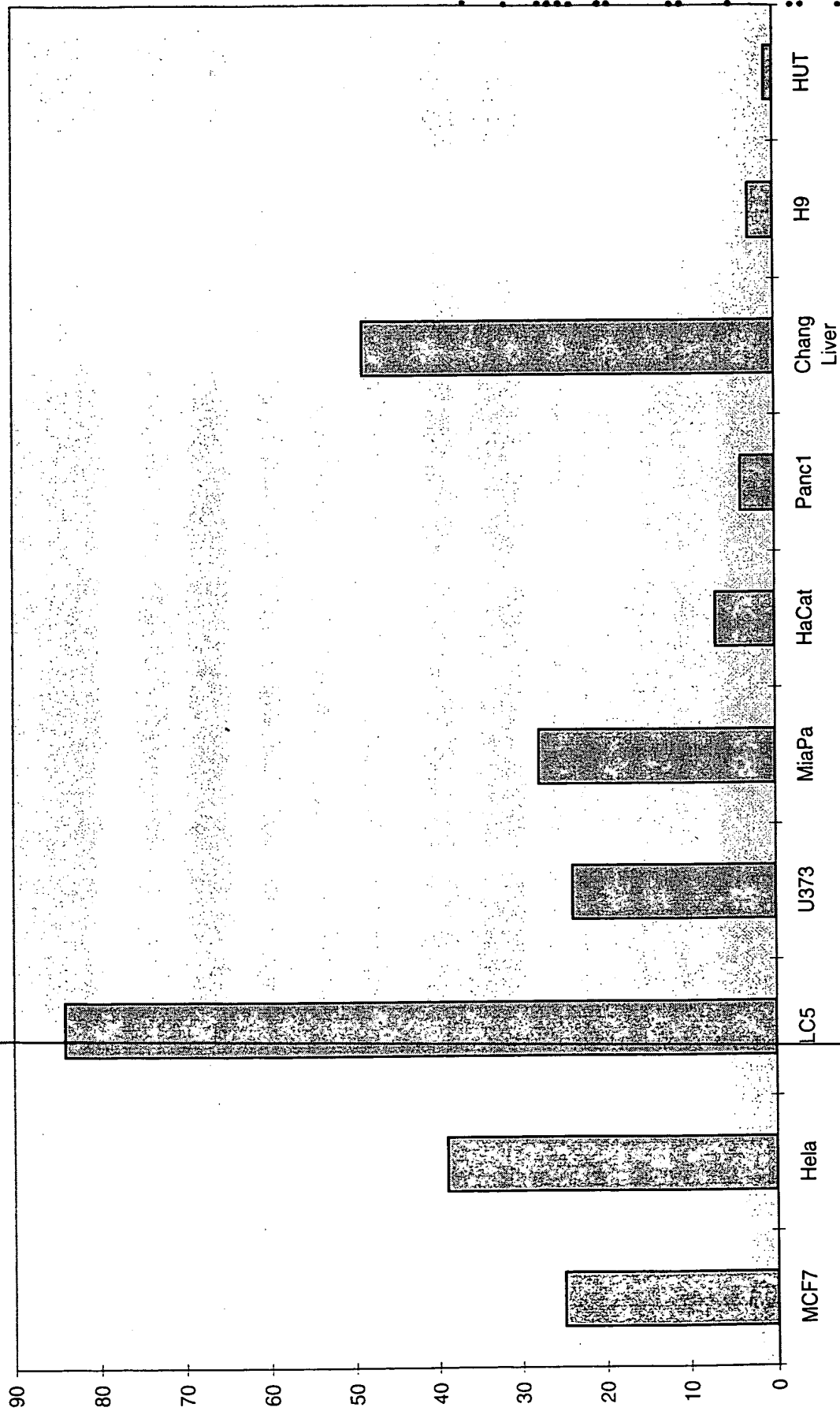


Abb.2b)

HERV-E

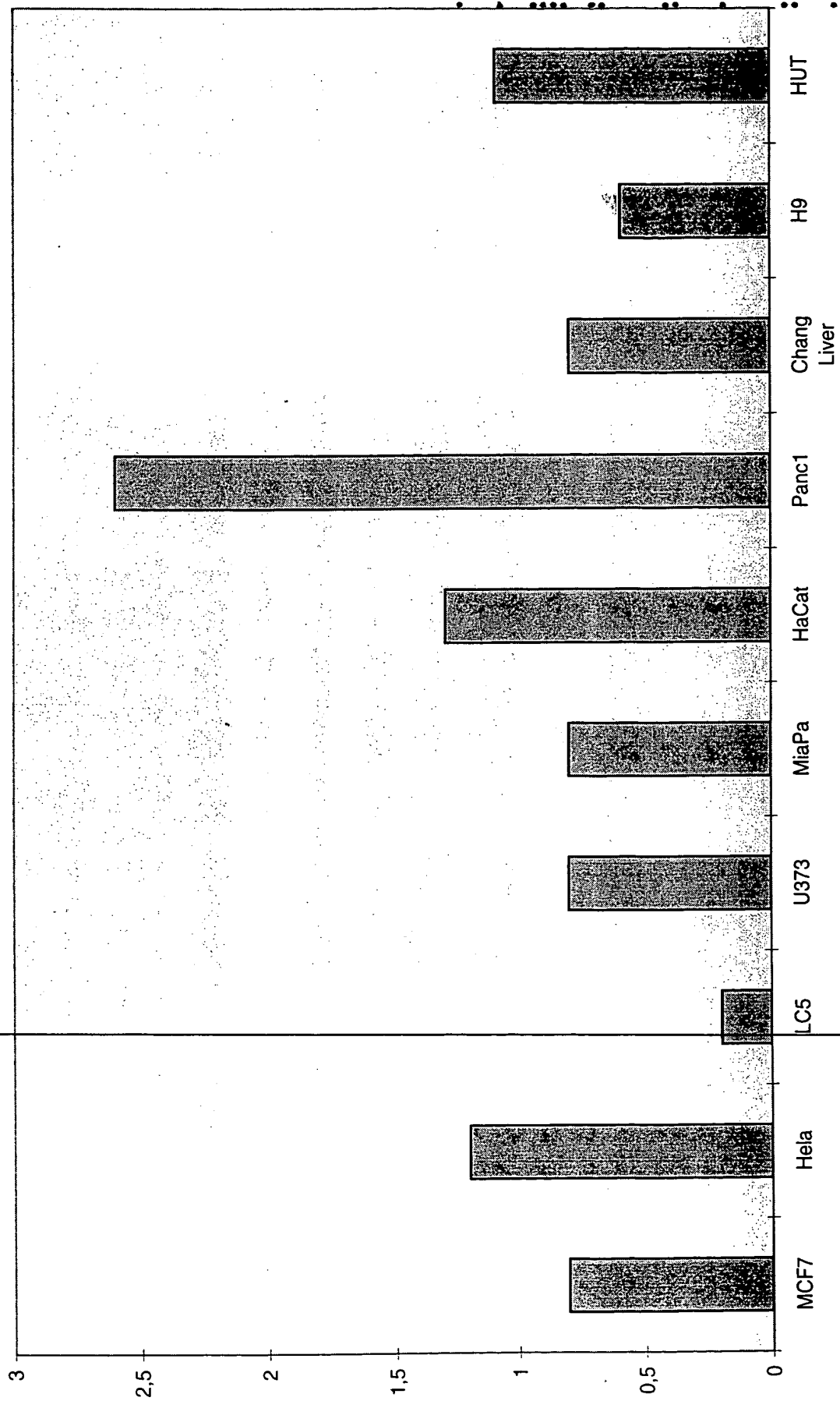
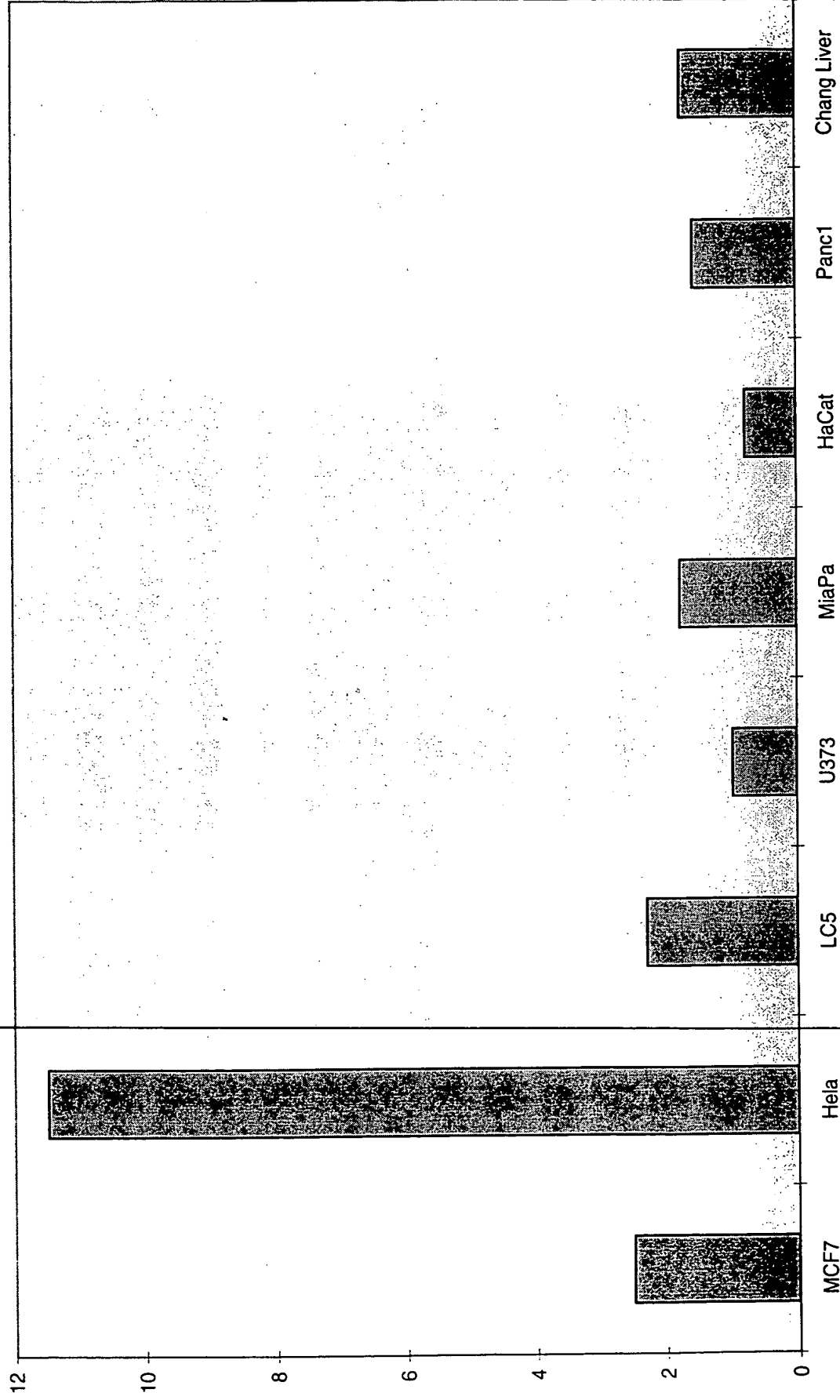


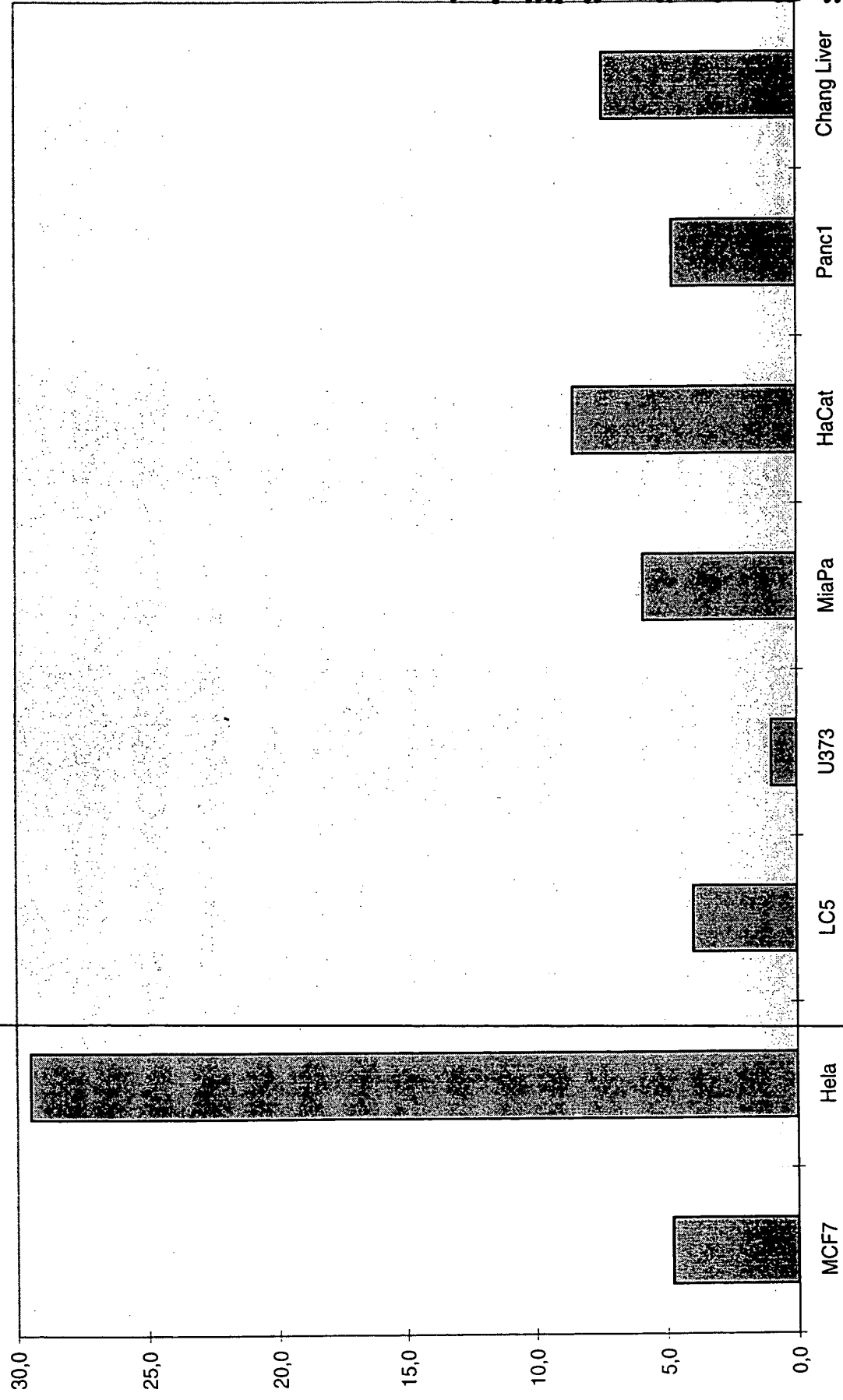
Abb.2c)

HERV-Kp1167



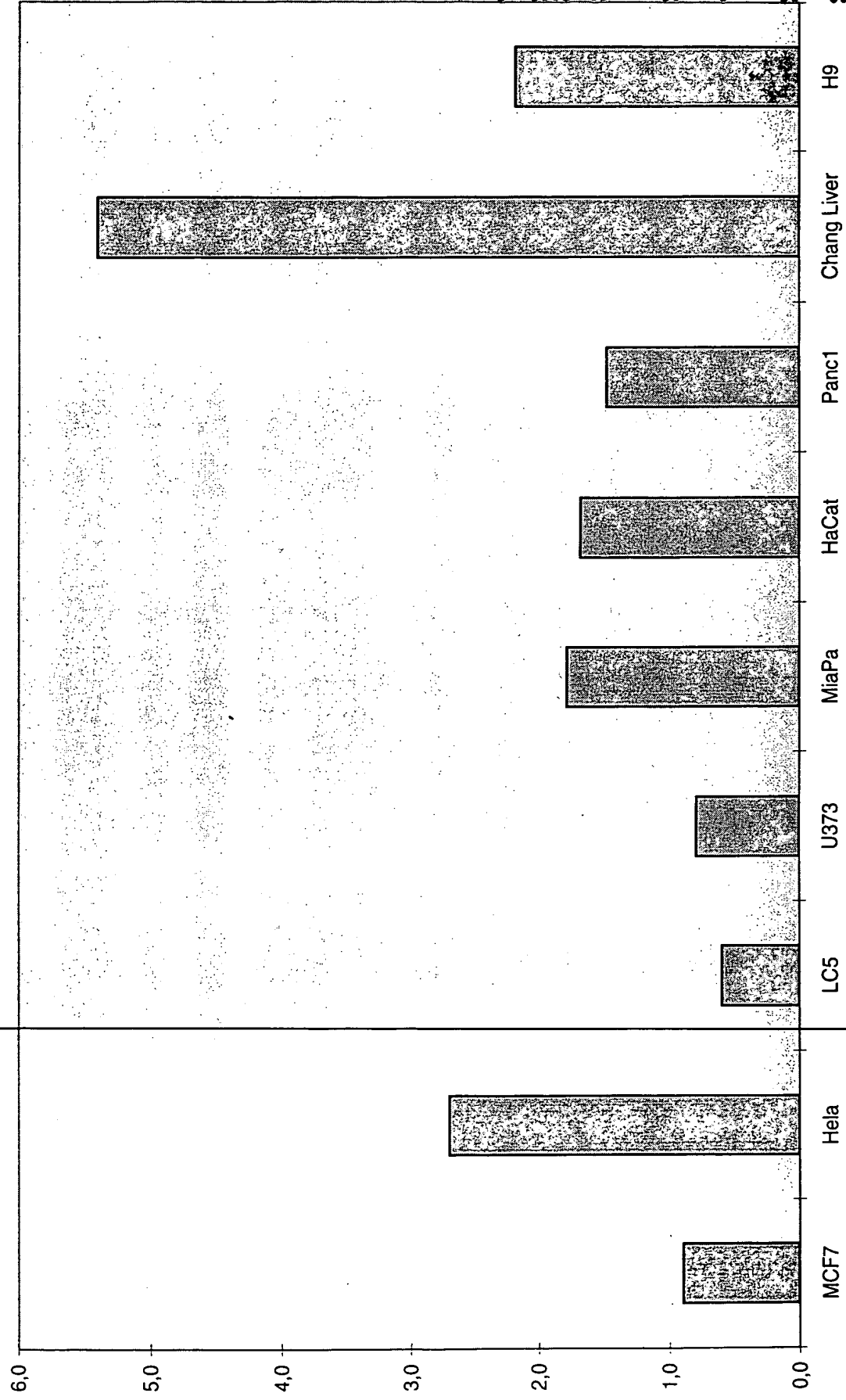
HERV-K-T47D

Abb.2e)



HERV-T

Abb.2f)



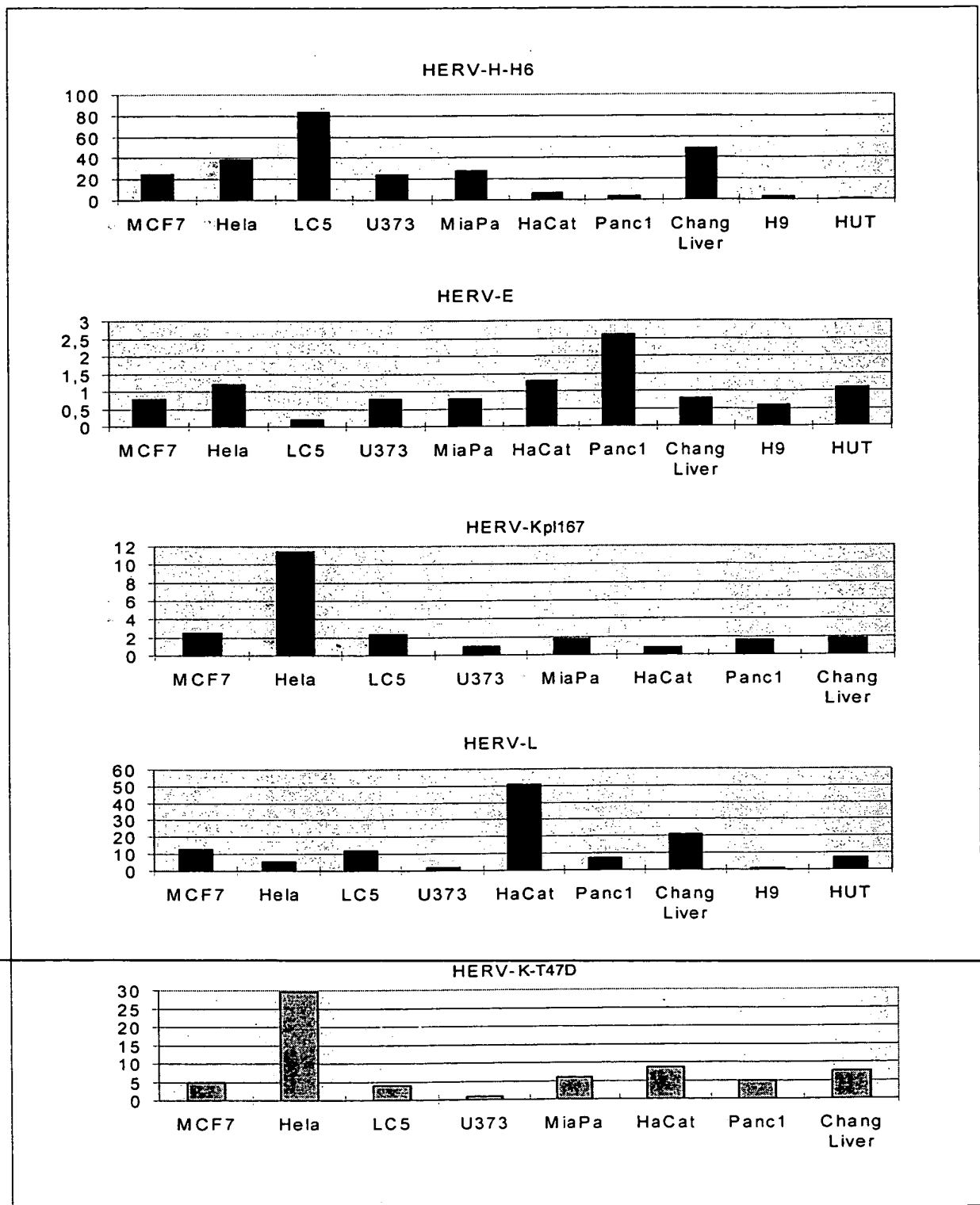
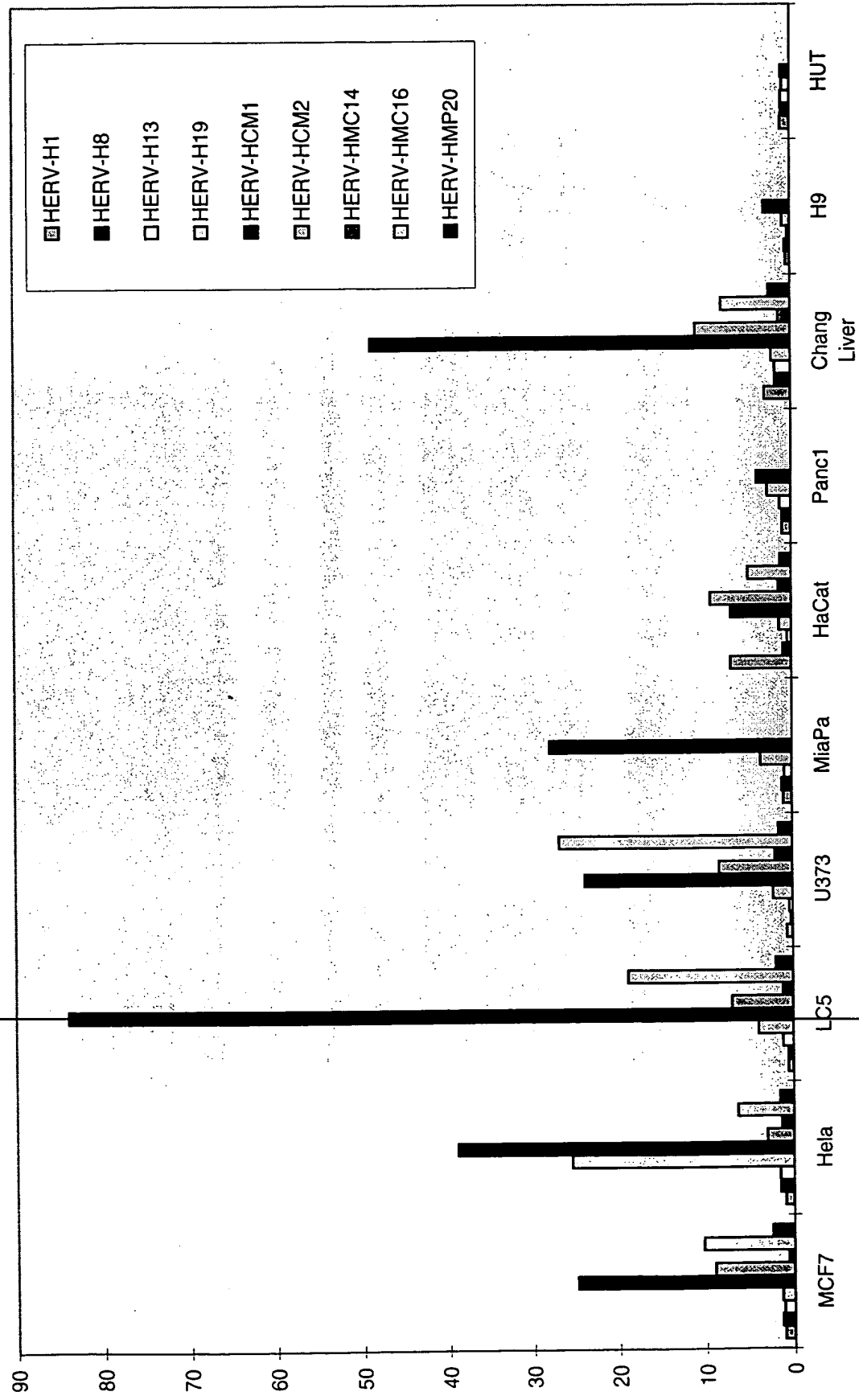


Abb. 29: Relative Promotoraktivitäten verschiedener LTRs in unterschiedlichen Zelllinien

Abb.3: Relative Promotoraktivitäten verschiedener HERV-H LTRs



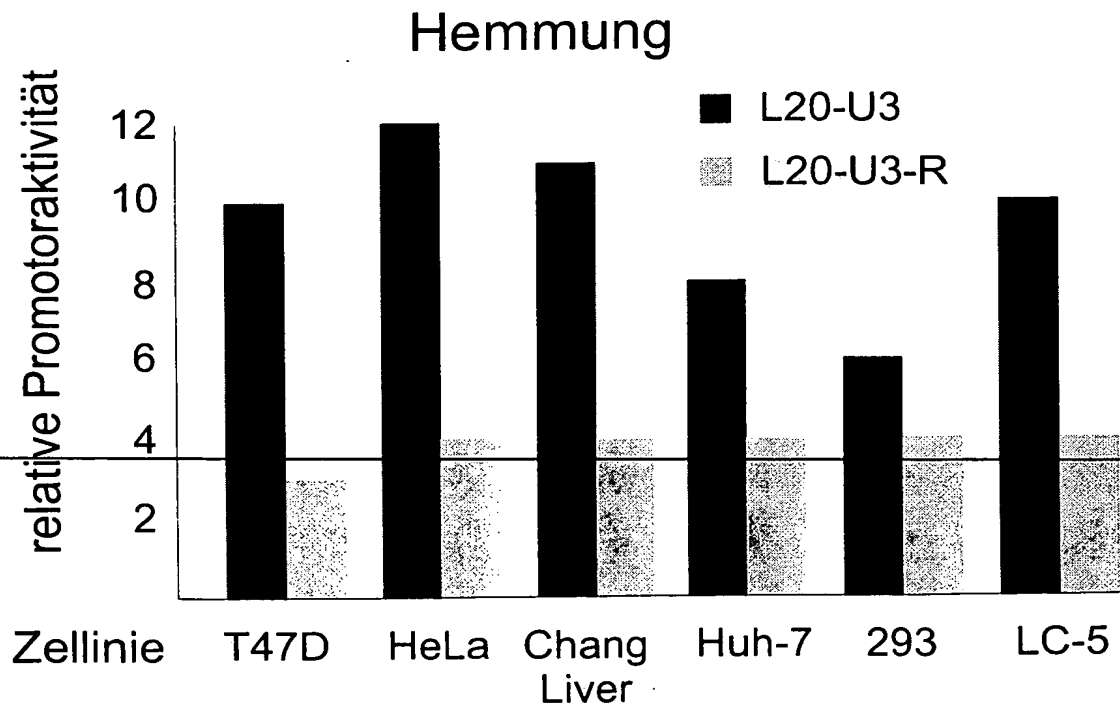
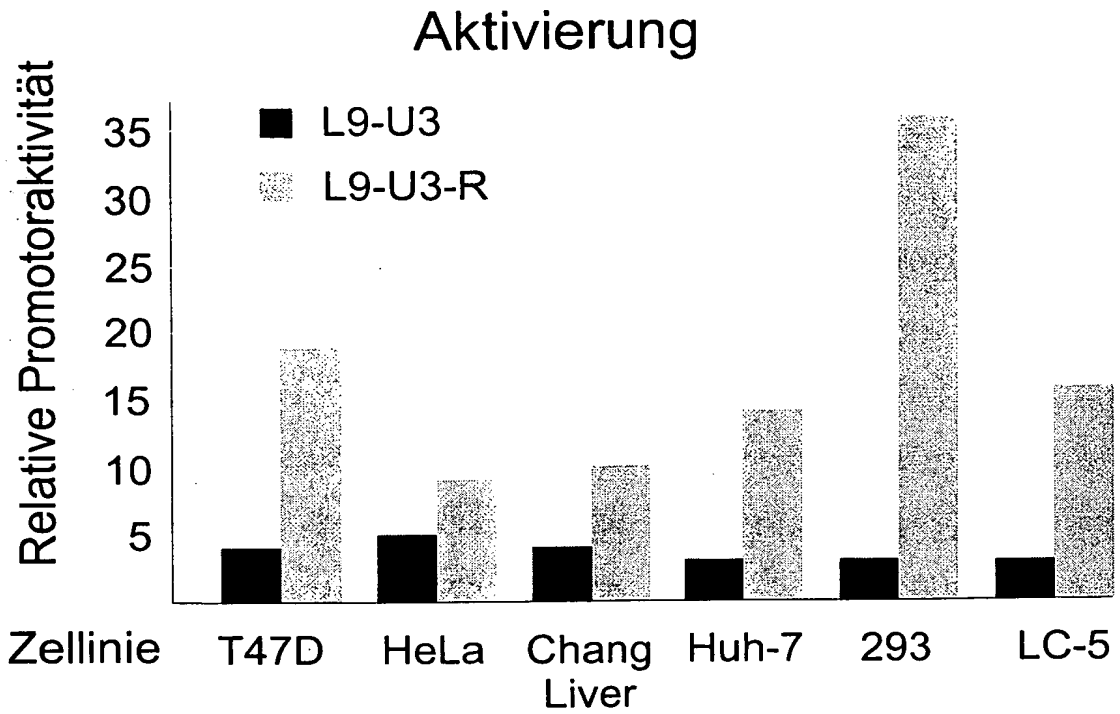


Abb.4: Einfluß der LTR-R Region auf die HERV Promotoraktivität

■ HERV-K-T47D-LTR-U3
 ■ HERV-K-T47D-LTR-U3/R
 ■ HERV-K-T47D-LTR-U3/R/U5/5'gag

Relative Promotoraktivität

1000
100
10
1

T47D

HeLa

Chang
Liver

Huh-7

293

LC-5

Zelllinie

Abb.5: Abhängigkeit der HERV-Promotoraktivität von Sequenzen downstream der LTR-U3 Region

U3 ↔ R

Inr

HERV-K-T47D

L5 AAACCCCTCCCTGTGGTGTCTGCTTGAATGCGCCACTTCTTGTGTCACCTTCACTTCTCCTGTTCTCTTGAAGTTCCTAGAACATATGGTAGAAGAAATAGTGAA
 L50 A.....T.....A.....T.CCAC.C..T.....C.....C.CG.....C.....AG..C..T.....GCG.....A.....T.....
 L8 A.....C.....A.....T.CCAC.C..T.....C.....C.CG.....C.....AG..C..T.....GCG.....A.....T.....
 L9 A.....C.....A.....G.ACAC.C..C.....T.....C.CA.....T.....C.CA.....T.....GTT..T..T.....GTG.....G.....G.....
 L48 G.....C.....A.....T.ACGT.C..T.....C.....T.CG.....T.....T.T..T.....GCG.....A.....T.....
 L20/L49 A.....C.....G.....T.ACTC.C..T.....T.....C.CG.....T.....T.T..T.....GCA.....A.....T.....

584
583
583
599
599
587
596

HERV-K-T47D

L5 AGTCTT-----TGATCTTTCTTATAAGTGCATAGAGAAACACTGATGCTGCTGCCCTTCCCT--CTCTGCTTCACTACCTAAAA-GGAAGGCCCCCTTTCCCATGATCACA
 L50 .G...AAAGTCTTC.....C...G..G.....G...CATA..-T.....C...-C...TTCG.....A.G...G...GC.TATCTG.A...CA.
 L8 .G...AAAGTCTTC.....C...G..G.....G...CATA..-T.....C...-C...TTCG.....A.G...G...GC.TATCTG.A...CA.
 L9 .A...AAAGTGTTT.....T...G..T.....G...CATA..-T.....C...-G...TTCA.....G.G...G...CC.TGTCCAG.G...CG.
 L48 .A...AAAGTGTTT.....T...G..T.....G...CATA..-T.....C...-G...TTCA.....G.G...G...CC.TGTCCAG.G...CG.
 L20/L49 .G...AAAGTCTTT.....T...T..T.....G...TGCC..-C...T..-TC...TTCA.....G.G...G...CG.TGTCTG.G...GG.
 .G...AAAGTATTT.....T...G..T.....G...CATA..-T.....T..ATC.....GGTG.....A.G...G...CC.TGTCCA.G...CATGT

693
700
700
716
716
700
715

AP-1

SP1

poly A

HERV-K-T47D

L5 GACTTGCTGACCTTATCAATCACTTGGAGGACTCACCTCCTTACCTG--TCCTTTGTCTTGTATGTCATATAATATCAGCACGCCAGCCACTTCGGGCCACT-ACTGGTCTCGGCA
 L50T.C.....G.....A..A..T.C.CT.....AC...G--C...C.....TGAC.....C.G..CAGGG.....-A..T.....GCG
 L8T.C.....G.....A..A..T.C.CC.....AC...G--C...C.....TGAC.....C.G..CAGGG.....-A..T.....GCG
 L9T.C.....G.....A..A..T.C.CC.....AC...G--C...C.....TGCA.....C.T..CGG.....-TA..C.....ACG
 L48T.C.....G.....A..A..C.G.CC.....AT..G--C...C.....TGCA.....C.T..CGGG.....TA..C.....ACG
 L20/L49T.C.....G.....A..A..T.C.TC.....AC...GCGC...C.C.....CAGG.....T..G..TGAGG.....-G..C.....GCG

810
817
817
833
834
817
830

R ↔ U5

HERV-K-T47D

L5 ACTTGGTGGTAGTGATACCTTGGGCCAGCTGTTTCTCTTTA
 L50 T...GA.....CA..CC.....
 L8 T...GA.....CA..CC.....
 T...GG.....-C..CC.....C.G..T.C.....

584
583
583
599
599
587
596

Abb.6: regulatorische Elemente in der R-Region von HERV-K-T47D LTRs

11.2004.00

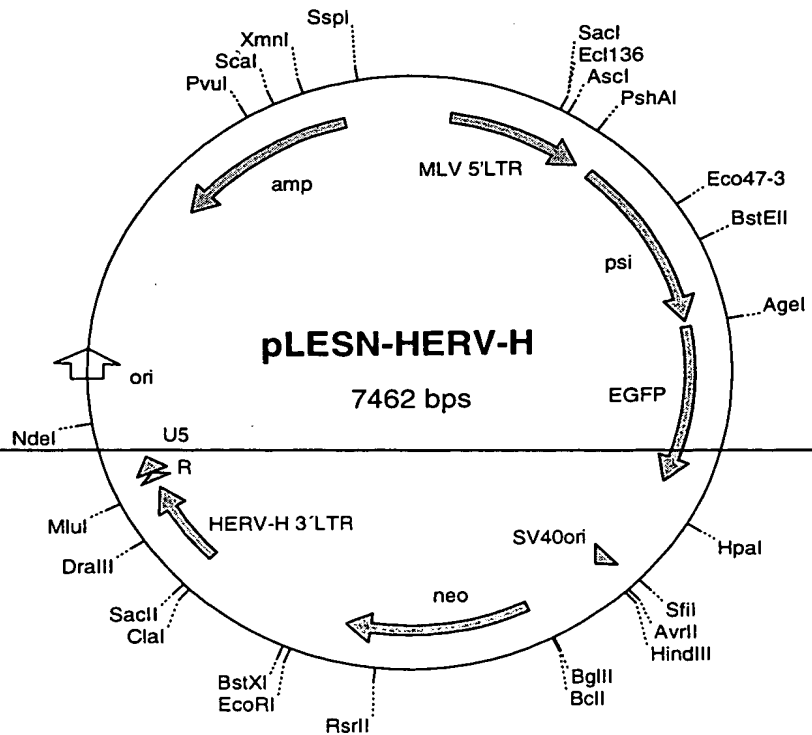
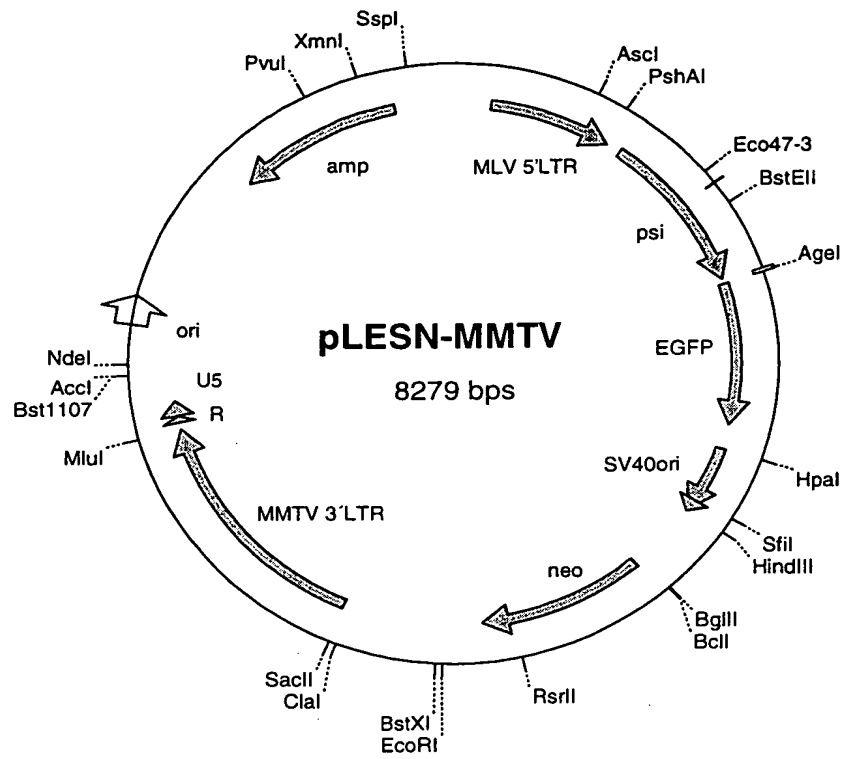


Abb.7: Retrovirale ProCon Vektoren pLESN-MMTV und pLESN-HERV-H

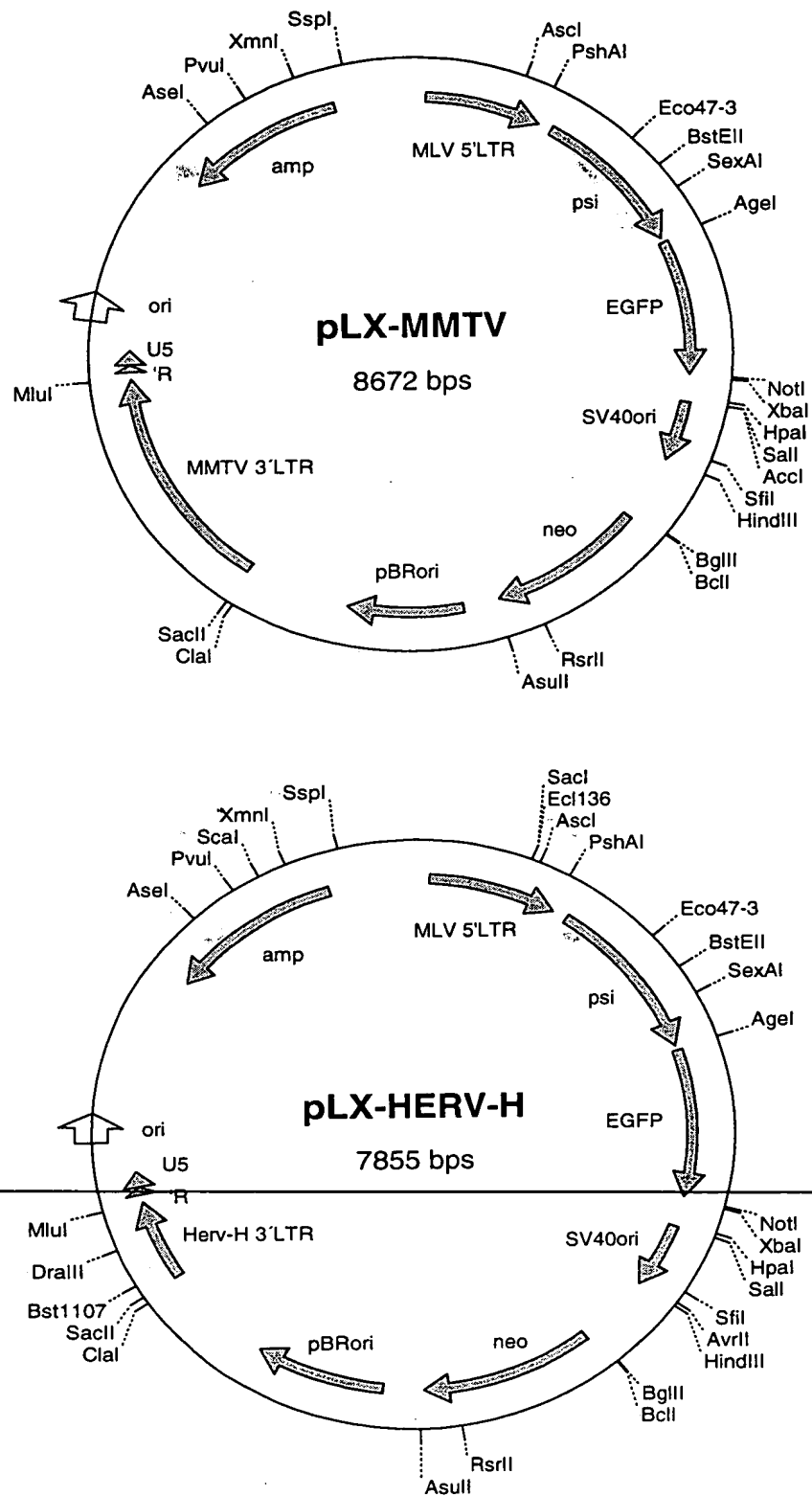
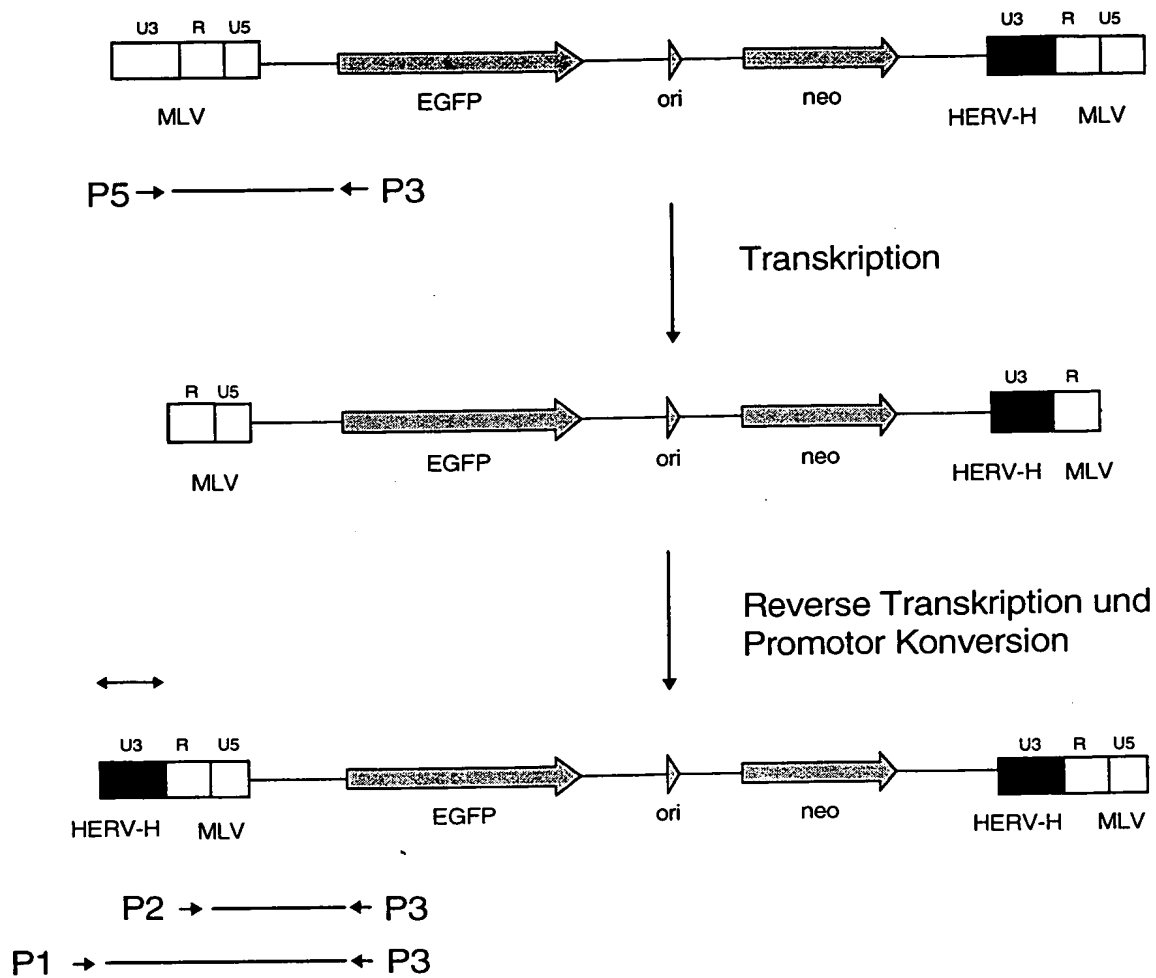


Abb.8: Retrovirale ProCon Vektoren pLX-MMTV und pLX-HERV-H

a)



b)

1: CK
2: CK-pLX-MMTV
3: CK-pLX-HERV-H

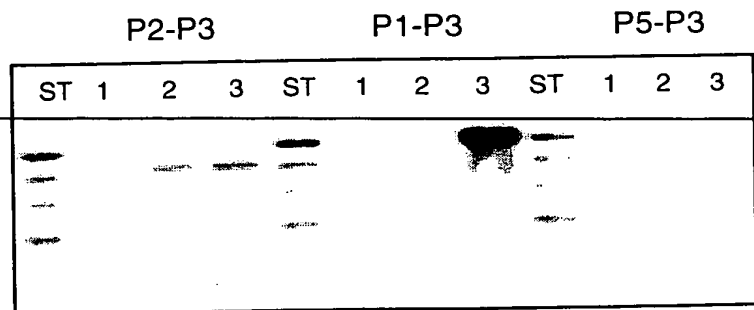
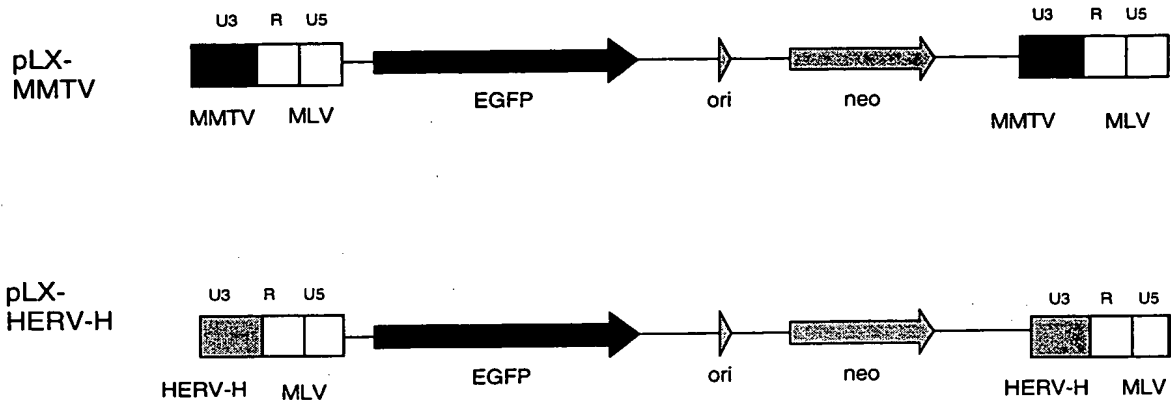
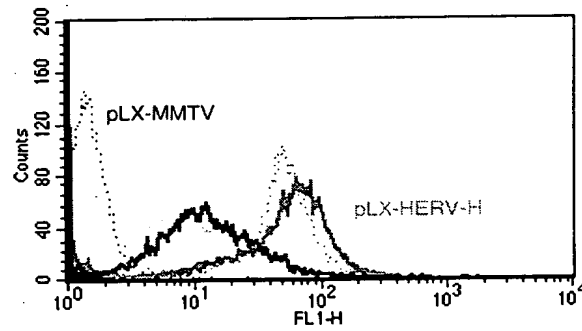


Abb.9: a) Promotorkonversion des hybriden ProCon Vektors
b) Nachweis der korrekten Promotorkonversion mittels PCR und Hybridisierung mit einer HERV-H Sonde



FACS-Analysen



Mittlere Fluoreszenz

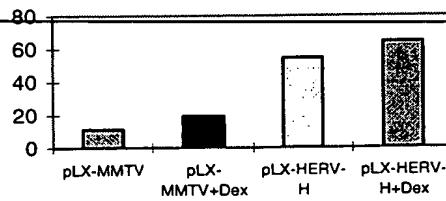


Abb.10: Promotoraktivität der HERV-H LTR im Vergleich zur MMTV-LTR nach Infektion von CrfK-Zellen